

Untersuchungen zur Induktion der Mastzell-Differenzierung durch den Zellkontakt zu Fibroblasten

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

im Fach Biologie

eingereicht an der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I

Humboldt-Universität zu Berlin

von

Diplom-Biologin Mandy Leist, geborene Grusser

Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin:

Prof. Dr. Jan-Hendrik Olbertz

Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I:

Prof. Stefan Hecht, Ph.D.

Gutachter:

1. Prof. Dr. med. Marcus Maurer
2. Prof. Dr. rer. nat. Alf Hamann
3. Prof. Dr. med. Hans-Dieter Volk

eingereicht am: 31. Juli 2012

Tag der mündlichen Prüfung: 07. Februar 2013

Für meine Familie und meine Freunde.

*"Nichts wahrhaft Wertvolles erwächst aus Ehrgeiz oder bloßem Pflichtgefühl,
sondern vielmehr aus Liebe und Treue zu Menschen und Dingen."*

Albert Einstein
(dt.-amerikan. Physiker, 1921 Nobelpreis für Physik, 1879 - 1955)

Danksagung

Zuerst danke ich Professor Dr. Marcus Maurer für die Bereitstellung des sehr spannenden Themas und dafür, dass ich die Arbeiten zur vorliegenden Dissertation als Mitglied seiner Arbeitsgruppe durchführen konnte. Weiterhin danke ich ihm für viele kritische und inspirierende Diskussionen sowie für seine Betreuung, die selbstständiges und eigenverantwortliches Arbeiten stark förderte und forderte.

Ein herzlicher Dank gilt Dr. Anne Dudeck für das Thema und ihre Unterstützung in den vergangenen Jahren. Viele motivierende Gespräche mit ihr sowie ihre freundschaftlichen Ratschläge bestärkten mich auf meinen Wegen.

Meiner Weggefährtin Dr. Cathleen Sünder danke ich von Herzen für die vielen gemeinsamen Stunden in Labor und Büro, das grandiose zahnradchenhafte Ineinandergreifen, ihre Hilfsbereitschaft und die zahllosen anregenden Diskussionen. Nicht minder bin ich ihr dankbar für die schöne Zeit abseits der Arbeit und ihre Freundschaft.

Der gesamten Arbeitsgruppe Maurer und ihren ehemaligen Mitarbeitern und Gästen danke ich sehr für die angenehme Arbeitsatmosphäre, den regen fachlichen Austausch, die gute Zusammenarbeit und auch für die gemeinsamen Erlebnisse neben der Arbeit. Insbesondere seien Marina Frömming, Sina Heydrich, Stefanie Gemeiner und Joanna Wollny erwähnt, da sie mit ihrer tatkräftigen Unterstützung zum Gelingen dieser Arbeit beitrugen. Den Dres. Martin Metz und Frank Siebenhaar danke ich für konstruktive Kritik und inspirierende Gespräche.

Vielen weiteren derzeitigen und ehemaligen Mitarbeitern der Klinik für Dermatologie gilt mein Dank. Insbesondere Dennis Ernst und Sven Guhl bin ich für die stets vorhandene Hilfsbereitschaft bei verschiedensten Schwierigkeiten und die Auflockerung im Laboralltag sehr dankbar. Ein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Florian Losch, der nicht nur im Rahmen seines großartigen Doktorandenseminars fachliche und moralische Unterstützung gab. Ebenfalls hervorheben möchte ich meine Dankbarkeit gegenüber Stefan Kirsch, Dr. Kerstin Geldmeyer-Hilt, Dr. Björn Hartmann, Dr. Anja Köhler, Dr. Christin Weise, Dr. Miriam Gerstenberg und Dr. Kathi Westphal für ihre Hilfsbereitschaft, die freundschaftliche Zusammenarbeit und angenehme Stunden abseits vom Laboralltag.

Dr. Sebastian Drobe vom Institut für Immunologie des Universitätsklinikums Jena danke ich für die unkomplizierte Hilfe im Rahmen einer sehr guten Kooperation und die angenehmen Gespräche.

Meiner ganzen Familie, jedoch ganz besonders meinen lieben Eltern, gilt mein tiefster Dank für ihr unermessliches Vertrauen in mich und ihre nicht aufzuwiegende Unterstützung. Joanna danke ich unsagbar für die tiefe und ehrliche Freundschaft, die uns schon so lange verbindet. Sie findet immer die richtigen Worte und erweitert allezeit meinen Horizont. Ein herzlicher Dank gebührt Sophia, die mir besonders auf sportliche Weise zur Seite stand. Meinem Mann danke ich innig für seine Liebe und den bedingungslosen Rückhalt. Unseren Kindern gilt ein ganz besonderer Dank für ihre Geduld mit mir und die allerbeste Abwechslung von der Arbeit.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	IX
Zusammenfassung	XII
Abstract	XIV
1 Einleitung	1
1.1 Grundlagen der Biologie der Mastzelle	1
1.1.1 Einführung	1
1.1.2 Funktionen der Mastzelle	1
1.1.3 Ontogenie der Mastzellen	3
1.1.4 Heterogenität der Mastzellen	4
1.2 Einwanderung der Mastzell-Vorläuferzellen in die Gewebe	6
1.2.1 Beteiligung von Integrinen und Chemokinen bei Einwanderung unter physiologischen Bedingungen	6
1.2.2 Beteiligung von Integrinen und Chemokinen Einwanderung im Rahmen pathologischer Prozesse	6
1.3 Differenzierung der Mastzellen	7
1.3.1 Zytokine bei der Entwicklung von Mastzellen	8
1.3.1.1 Stammzellfaktor	8
1.3.1.2 Interleukin-3	10
1.3.1.3 Weitere Zytokine	11
1.3.2 Murine <i>in vitro</i> -Mastzell-Modelle	11
1.3.3 Mausmodelle mit Mutationen in Kit	12
1.3.4 Die Differenzierung von MZ durch die Cokultur mit Fibroblasten	13
1.3.5 Regulation der Mastzell-Zahlen im Gewebe	14
1.4 Ziele der Arbeit	15

2 Material	16
2.1 Geräte	16
2.2 Chemikalien und Reagenzien	17
2.3 Antikörper	19
2.4 Verbrauchsmaterialien	20
2.5 Puffer und Lösungen	22
2.6 Kits	22
2.7 Medien	23
2.8 Software	24
3 Methoden	25
3.1 Versuchstiere	25
3.2 Zellbiologische Arbeiten	25
3.2.1 Knochenmark-generierte kultivierte murine Mastzellen (BMCMC)	25
3.2.2 Verwendete Zelllinien	26
3.2.2.1 Swiss Albino 3T3 Fibroblasten	26
3.2.2.2 Hybridom-Zelllinie X63	26
3.2.3 Cokultur aus BMCMC und Fibroblasten	27
3.2.4 Ernte der Cokultur-Ansätze	27
3.2.5 Spezial-Cokultur	28
3.2.6 Zellzählung und Vitalitätsbestimmung mit Trypanblau - Lösung	28
3.3 Immunologische Arbeiten	29
3.3.1 Durchflusszytometrie	29
3.3.1.1 Spezifische Blockierung von CD16 (Fc γ RIII) und CD32 (Fc γ RII)	29
3.3.1.2 Färbung von Oberflächenmolekülen mit Fluorochrom-konjugierten Antikörpern	29
3.3.1.3 Färbung von Oberflächenmolekülen mit Primär- und Sekundärantikörpern	30
3.3.1.4 Färbung von Oberflächenmolekülen mit Biotin-konjugierten Primärantikörpern und Fluorochrom-konjugiertem Streptavidin	30
3.3.2 Magnetische Zellseparation der Cokulturzellen	30
3.3.2.1 Negative Selektion der MZ mit <i>EasySep[®] Mouse CD90.2 PE-Selection Kit</i>	31
3.3.2.2 Positive Selektion der MZ mit <i>EasySep[®] Mouse PE-Selection Kit</i>	31

3.3.3	Enzym-gekoppelter Immunadsorptionstest (ELISA)	32
3.3.3.1	Probengewinnung für ELISA	32
3.3.4	Untersuchung des Adhäsionsverhaltens von BMCMC an Fb	32
3.3.4.1	Analyse der Expression von Adhäsionsmolekülen auf den Fb	32
3.3.4.2	Analyse der Expression von Adhäsionsmolekülen auf den BMCMC	33
3.3.4.3	Adhäsionsversuche mit blockierten Adhäsionsmolekülen	34
3.3.4.3.1	Biotinylierung der BMCMC	34
3.3.4.3.2	Blockierung der Adhäsionsmoleküle auf Fb	34
3.3.4.3.3	Blockierung der Adhäsionsmoleküle auf BMCMC	35
3.3.4.3.4	Adhäsion und Fixierung	35
3.3.4.3.5	Färbung mit Streptavidin-Cy3 und Auswertung	36
3.3.5	Stimulation von BMCMC mit immobilisiertem VCAM-1	36
3.3.5.1	Bestimmung der relativen Proliferation mittels MTS	36
3.3.5.2	Ernte der Zellen zur Bestimmung der Differenzierung	37
3.4	Molekularbiologische Arbeiten	37
3.4.1	Isolation von Ribonukleinsäure	37
3.4.2	Expressionsanalyse mittels Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion	38
3.4.2.1	Reaktionsansatz für die cDNA-Synthese für RT-PCR	38
3.4.2.2	Primer-Design	39
3.4.2.3	Reaktionsansatz für die RT-PCR	39
3.4.2.4	Agarosegelelektrophorese zur Kontrolle der PCR	40
3.4.3	Quantitative Expressionsanalyse mittels Real-Time PCR	40
3.4.3.1	Reaktionsansatz für die RTq-PCR	41
3.4.4	Analyse des gesamten Transkriptoms mittels <i>Affymetrix Mouse Gene 1.0 ST Array</i>	42
3.4.4.1	Vorbereitung der Proben	42
3.4.4.2	Durchführung	42
3.4.5	Western Blot	42
3.5	Histologische Arbeiten	43
3.5.1	Gewebepräparation	43
3.5.2	Paraffin-Einbettung	43
3.5.3	Herstellung von Paraffinschnitten	43
3.5.4	Giemsa-Färbung an Paraffinschnitten	44
3.5.5	Mikroskopische Auswertung	44
3.6	Statistische Auswertung	44

4 Ergebnisse	45
4.1 Die Cokultur mit Fibroblasten induziert eine verstärkte Proliferation und die Differenzierung von Mastzellen	45
4.1.1 Die Fibroblasten-induzierte Proliferation der Mastzellen ist kontaktabhängig	45
4.1.2 Die Fibroblasten-induzierte Veränderung des Mastzell-Phänotyps ist kontaktabhängig	47
4.1.2.1 Der erhöhte Histamingehalt der kokultivierten Mastzellen ist kontaktabhängig	47
4.1.2.2 Die Expressionslevel von <i>mcpt4</i> und <i>hdc</i> sind in kokultivierten Mastzellen kontaktabhängig erhöht	48
4.2 Mastzellen adhären durch VCAM-1/ $\alpha_4\beta_7$ -Interaktion an Fibroblasten	49
4.2.1 VCAM-1 auf Fibroblasten ist an der Adhäsion von Mastzellen beteiligt	50
4.2.2 VCAM-1-Ligand $\alpha_4\beta_7$ -Integrin auf Mastzellen vermittelt die Adhäsion an Fibroblasten	52
4.3 Mastzellen zeigen Proliferation aber nicht Differenzierung nach Adhäsion an immobilisiertes VCAM-1	54
4.4 Von Swiss Albino 3T3 Fibroblasten exprimiertes SCF ²⁴⁸ verbleibt in der membranständigen Form	55
4.4.1 Swiss Albino 3T3 Zelllinie exprimiert lösliches SCF ²⁴⁸	56
4.4.2 Die Überstände der Cokultur enthalten kein lösliches SCF	56
4.5 Der SCF-Rezeptor Kit ist ein entscheidender aber nicht ausschließlicher Mediator der Fb-induzierten Effekte auf MZ	57
4.5.1 In Cokultur mit Fb ist die Proliferation von Kit-defizienten <i>Kit^{W-sh/W-sh}</i> -BMCMC deutlich geringer als die von Wildtyp-BMCMC	57
4.5.2 Die Fb-induzierte MZ-Differenzierung ist nicht ausschließlich Kit-abhängig	60
4.5.2.1 Die Expression von <i>hdc</i> und <i>mcpt4</i> durch <i>Kit^{W-sh/W-sh}</i> -CokuMZ ist im Vergleich zu der durch Wt-CokuMZ verändert	60
4.5.2.2 Der Histamingehalt von <i>Kit^{W-sh/W-sh}</i> -CokuMZ ist geringer als der von Wildtyp-CokuMZ	61
4.5.3 Während der erstmaligen Besiedelung der Haut ist die Anzahl dermalen MZ in <i>Kit^{W-sh/W-sh}</i> -Mäusen deutlich verringert	62
4.6 Das Adhäsionsverhalten von Kit-defizienten BMCMC ist mit dem von Wildtyp-BMCMC vergleichbar	63

4.7 Die Fb-induzierte Proliferation und -Differenzierung der MZ wird durch membranassoziierte Faktoren ausgelöst	65
4.8 Genomweite Expressionsanalyse zur Fibroblasten-induzierten Mastzellen-Differenzierung	67
4.8.1 Kontaktabhängig regulierte Gene	67
4.8.2 Kontaktunabhängig regulierte Gene	67
5 Diskussion	69
5.1 Die Cokultur mit Fibroblasten induziert eine verstärkte Proliferation und die Differenzierung von Mastzellen	69
5.2 Mastzellen adhären durch VCAM-1/ $\alpha_4\beta_7$ -Interaktion an Fibroblasten	71
5.3 Mastzellen zeigen Proliferation aber nicht Differenzierung nach Adhäsion an immobilisiertes VCAM-1	72
5.4 Von Swiss Albino 3T3 Fibroblasten exprimiertes SCF ²⁴⁸ verbleibt in der membranständigen Form	73
5.5 Der SCF-Rezeptor Kit ist ein entscheidender aber nicht ausschließlicher Mediator der Fb-induzierten Effekte auf MZ	74
5.6 Das Adhäsionsverhalten von Kit-defizienten BMCMC ist mit dem von Wildtyp-BMCMC vergleichbar	76
5.7 Die Fb-induzierte Proliferation und -Differenzierung der MZ wird durch membranassoziierte Faktoren ausgelöst	77
5.8 Genomweite Expressionsanalyse zur Fibroblasten-induzierten Mastzellen-Differenzierung	78
5.9 Schlussfolgerungen	80
Literaturverzeichnis	82
Publikationen	98
Eidesstattliche Erklärung	101

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
5-HT	Serotonin
Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
AMP	Adenosinmonophosphat
AP	Alkaline Phosphatase
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaar
BMCMC	<i>bone marrow-derived cultured mast cell</i> (Knochenmark-generierte kultivierte Mastzelle)
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i> (Rinderserumalbumin)
CCL	<i>CC-motif chemokine ligand</i>
CD	<i>Cluster of Differentiation</i> , Differenzierungsantigen
cDNA	<i>complementary deoxyribonucleic acid</i> (komplementäre DNA)
CO₂	Kohlenstoffdioxid
CokuMZ	MZ, mit Fb kokultiviert
CTMC	<i>Connective tissue mast cell</i> (Bindegewebsmastzelle)
CXCL	<i>CXC-motif chemokine ligand</i>
CXCR	<i>CXC-motif chemokine receptor</i>
Cy-3®	<i>Cyanine Dye 3</i>
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
DDC	DOPA Decarboxylase
ddH₂O	doppelt destilliertes Wasser
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbed Assay</i>
Etar-1	Endothelinrezeptor Typ A
EtBr	Ethidiumbromid
FACS	<i>Fluorescence activated cell sorting</i> (Fluoreszenz-aktivierte Zytometrie)
Fb	Fibroblast
FBS	<i>Fetal calf serum</i> (Fötales Rinder Serum)

FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FSMC	<i>fetal skin mast cells</i> (fötale Haut-MZ)
g	Erdbeschleunigung
ggf.	gegebenenfalls
h	Stunde
HDC	Histidin Decarboxylase
HPRT	Hypoxanthin-guanin-phosphoriboxyltransferase
HRP	<i>Horsereddish-peroxidase</i> (Meerettich-Peroxidase)
ICAM-1,-2	<i>Intercellular cell adhesion molecule-1,-2</i>
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
InMZ	MZ, ohne direkten Zellkontakt mit Fb kokultiviert
JAM-1,-2,-3	<i>Junctional adhesion molecule-1,-2,-3</i>
kb	Kilobasenpaar
KL	Kit Ligand
Mb	Megabasenpaar
MgCl₂	Magnesiumchlorid
min	Minute
MC-CPA	<i>Mast cell carboxypeptidase A</i>
MCP	<i>Mast cell committed progenitor</i> (MZ-Vorläuferzelle)
MCPT4,-5	<i>Mast cell protease 4,-5</i>
MMC	Mucosal mast cell (Mukosale bzw. Schleimhaut-Mastzelle)
mRNA	<i>messenger RNA</i> (Boten-RNA)
MZ	Mastzelle(n)
n	Anzahl
NaCl	Natriumchlorid
NaH₂PO₄	Natriumhydrogenphosphat
NaOH	Natriumhydroxid
NCBI	<i>National Center of Biotechnology Information</i>
O₂	Molekularer Sauerstoff
OD	Optische Dichte
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i> (Phosphat-gepuffertes Natriumchlorid)
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> (Polymerase-Kettenreaktion)
PE	Phycoerythrin
PECAM-1	<i>platelet/endothelial cell adhesion molecule-1</i>
RNA	<i>Ribonucleic acid</i> (Ribonukleinsäure)
RT-PCR	Reverse Transkriptase - PCR
s	Sekunde
SA	Streptavidin
SCF	<i>Stem cell factor</i> (Stammzellfaktor)
SDS-PAGE	<i>Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel-electrophoresis</i>

SI	<i>Steel allele</i>
SO₄²⁻	Sulfat
spMZ	MZ, im Überstand einer FB/MZ-Cokultur kultiviert
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
Tris	Tris-(hydroxymethyl)aminomethan)
TNF	Tumornekrosefaktor
U	Units (Enzymeinheiten)
U/min	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
V	Volt
vgl.	vergleiche
VCAM-1	<i>Vascular cell adhesion molecule-1</i>
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>
W	dominant-white spotting allele
Wt	Wildtyp

Zusammenfassung

Die Anzahl von Mastzellen (MZ) in den peripheren Geweben ist unter normalen physiologischen Bedingungen relativ konstant, wird jedoch im Rahmen von entzündlichen Reaktionen stark reguliert. Die genauen Mechanismen der MZ-Homöostase sind jedoch weitgehend unbekannt. Die Regulation der MZ-Zahlen in den peripheren Geweben schließt aber sehr wahrscheinlich die lokale Proliferation der Gewebe-MZ sowie die Rekrutierung und nachfolgende Differenzierung von MZ-Vorläuferzellen ein. Um dies näher zu untersuchen, wurde die Proliferation und die Expression von Differenzierungsmarkern reifer Bindegewebs-MZ (CTMC) von unreifen Knochenmark-generierten MZ (BMCMC) nach der Cokultur mit Fibroblasten (Fb) analysiert. Da MZ eine feste dauerhafte Adhäsion an die Swiss albino 3T3 Fb eingehen, wurde die Hypothese aufgestellt, dass dieser direkte Zellkontakt für die Proliferation und die Differenzierung der unreifen BMCMC zu reifen CTMC wichtig ist. Tatsächlich konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass der erhöhte Histamingehalt und die Induktion der Expression der MZ Protease 4 (MCPT-4) mRNA, beides typische Marker der CTMC, nur nach direktem Zellkontakt auftreten. Die durch die Fb verstärkte Proliferation der BMCMC war ebenfalls kontaktabhängig. Mit Hilfe von blockierenden Antikörpern konnte nachgewiesen werden, dass die Interaktion von dem $\alpha_4\beta_7$ Integrin auf den BMCMC und dem *Vascular Cell Adhesion Molecule 1* (VCAM-1) auf den Fb zum großen Teil an der Adhäsion beteiligt sind. Des Weiteren konnte ausgeschlossen werden, dass die $\alpha_4\beta_7$ /VCAM-1-Interaktion selbst die Proliferation und Differenzierung der BMCMC auslöst. Interessanterweise zeigten, wenn gleich in einem geringeren Ausmaß, BMCMC die Kit, den Rezeptor für den MZ-Wachstumsfaktor Stammzellfaktor (SCF), nicht exprimieren, ebenfalls eine signifikante Steigerung des Histamingehaltes, eine Fb-induzierte verstärkte Proliferation und die Expression von *mcpt4*. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass Fb die MZ sowohl unter Beteiligung von Kit-abhängigen, als auch von Kit-unabhängigen Signalwegen beeinflussen können. Weiterführende Experimente konnten zeigen, dass die Kit-abhängig und -unabhängig induzierten Veränderungen der BMCMC direkt von Membran-assoziierten Faktoren abhängen; nicht von löslichen Mediatoren, die möglicherweise nach der Adhäsion von Fb oder BMCMC freigesetzt werden könnten. Durch die genomweite Expressionsanalyse der mit oder ohne direkten Zellkontakt zu den Fb kokultivierten BMCMC und der Kontrollen, konnte die kontaktabhängige Hochregulation der Expression weiterer Gene, die mit dem Phänotyp ausgereifter CTMC assoziiert sind, nachgewiesen werden. Des Weiteren konnte die Verringerung der Expression bestimmter

Gene gezeigt werden, die von unreifen MZ oder MZ-Vorläufern exprimiert werden. Insgesamt zeigen die Daten der hier vorliegenden Arbeit, dass für die durch Fb ausgelöste Differenzierung und Ausreifung von unreifen MZ zu CTMC, eine teilweise durch VCAM-1/ $\alpha_4\beta_7$ vermittelte direkte Zell-Zell-Interaktion notwendig ist, bei der sowohl Kit-abhängige, als auch Kit-unabhängige Signalwege involviert sind.

Therapeutische Ansätze die darauf abzielen die MZ-Zahlen in Geweben über SCF bzw. Kit zu regulieren, können unvorhersehbare Risiken bergen, da Kit auf nahezu allen myeloiden Vorläuferzellen exprimiert wird. Somit würde die Identifikation alternativer Signalwege, welche die MZ-Proliferation und -Differenzierung auslösen, interessante therapeutische Ansätze aufdecken, die es ermöglichen könnten, MZ-bedingte Erkrankungen abzumildern.

Abstract

Peripheral tissue mast cell (MC) numbers are relatively constant in steady state but regulated extensively under inflammatory conditions. The precise mechanisms of MC homeostasis, however, are largely unknown. Regulation of MC numbers is assumed to involve the proliferation of local MCs and the recruitment and subsequent differentiation of MC precursors. To address this, the MC proliferation as well as phenotypical markers of differentiation towards connective tissue type MCs (CTMCs), were assessed in immature MCs, i.e. bone marrow-derived cultured MCs (BMCMCs), cocultured with fibroblasts (Fbs). MCs exhibited a tight and enduring adhesion to Fbs, therefore it was hypothesized, that this adhesion and cell-to-cell crosstalk is important for the differentiation of immature MCs. Indeed, it was found that Fb-cocultured immature MCs exhibit increased histamine content and the induced expression of mast cell protease 4 (*mcpt4*) mRNA, both markers for mature CTMC, and that these changes required a directed cell-to-cell interaction. Increased proliferation of BMCMC induced by Fb was contact-dependent as well. Using blocking mAbs, it could be shown that an interaction of the $\alpha_4\beta_7$ integrin on BMCMCs with Fb-expressed Vascular Cell Adhesion Molecule 1 (VCAM-1) is largely responsible for the adhesion of BMCMCs. Furthermore, the $\alpha_4\beta_7$ /VCAM-1-interaction itself has been proven to be not responsible for the proliferation and the phenotypical changes of BMCMCs. Most notably, MCs deficient for Kit, the receptor for the MC growth factor stem cell factor (SCF) also showed a significant Fb-induced increase in histamine content, *mcpt4* expression, and proliferation, albeit to a lesser extent than wildtype BMCMCs. These findings suggest that Fbs impact MC differentiation by variable pathways that are either SCF/Kit-dependent or -independent. Further experiments revealed that both, Kit-dependent and -independent pathways, were induced directly by membrane-associated factors, but not by soluble mediators, possibly released after adhesion of BMCMCs and Fbs. Whole genome expression analysis showed substantial changes in the gene expression profile of BMCMC after 11 days coculture with Fbs. Thereby, after direct cell-to-cell contact, several genes associated with CTMC phenotype and functions were upregulated, whereas genes associated with MC progenitors were downregulated.

Collectively, the data show that the Fb-induced differentiation of immature MCs towards CTMCs requires a VCAM-1/ $\alpha_4\beta_7$ -mediated cell-to-cell interaction and involves both Kit-dependent and -independent signaling pathways. Of note, therapeutic strategies to regulate peripheral tissue MC numbers blocking the Kit/SCF axis may involve unpredictable risks since Kit is expressed on almost

all myeloid progenitor cells. Thus, the identification of alternative signalling pathways triggering MC differentiation may reveal interesting therapeutic targets to alleviate MC-driven diseases.

1 Einleitung

1.1 Grundlagen der Biologie der Mastzelle

1.1.1 Einführung

Die Geschichte der Mastzell-Forschung begann mit der Beschreibung der Mastzellen (MZ) als eigene Zellpopulation im Jahr 1878 durch Paul Ehrlich [1], einem der bedeutendsten deutschen Wissenschaftler, der sich in jener Zeit ausgiebig mit histologischen Färbungen beschäftigte. Er begründete die Bezeichnung Mastzelle mit dem Umstand, dass ihm jene Anilin-positiv gefärbten Zellen, aufgrund deren starker Granulierung und Lokalisation, als gemästete Bindegewebszellen erschienen [2, 3]. Je nach anatomischer Lokalisation können MZ eine runde oder auch spindelförmige Gestalt aufweisen. Sie besitzen einen einzelnen nicht segmentierten Zellkern. Ihr Durchmesser beträgt 9-20 μm . Das hervorstechende morphologische Merkmal der MZ ist jedoch die hohe Anzahl zytoplasmatischer Granula mit metachromatischen Färbeeigenschaften [4]. Des Weiteren sind MZ durch die Expression des hochaffinen Rezeptors ($\text{Fc}_\epsilon\text{RI}$) für das Immunglobulin E (IgE) und des Stammzellfaktor-Rezeptors (Kit) charakterisiert [5]. MZ befinden sich in mäßiger Anzahl in parenchymatösen Organen (z.B. Milz, Leber oder Niere), treten jedoch vermehrt in den Schleimhäuten des Magen-Darmtraktes, der Atemwege und in der Haut auf. In der Haut sind sie primär in der oberen Dermis, insbesondere in der näheren Umgebung von Blutgefäßen und Nerven, lokalisiert. MZ sind demnach im Allgemeinen in Geweben und Organen angesiedelt, die die äußere Barriere des Organismus zur Umwelt bilden [4, 6]. Durch die Produktion zahlreicher biologischer Mediatoren wie beispielsweise Histamin, Proteasen, Zytokine, Chemokine und Wachstumsfaktoren können MZ verschiedenste physiologische und pathophysiologische Prozesse beeinflussen [6–8].

1.1.2 Funktionen der Mastzelle

MZ spielen eine zentrale Rolle bei allergischen Reaktionen. Sie exprimieren den hochaffinen IgE-Rezeptor $\text{Fc}_\epsilon\text{RI}$, dessen Quervernetzung durch IgE und spezifisches Allergen zur Degranulation der MZ führt [9], was die Symptome allergischer Reaktionen verursacht. Durch die Degranulation der MZ kommt es zur sofortigen Freisetzung zahlreicher pro-inflammatorischer, präformiert vorliegender Mediatoren, wie Histamin, Heparin, Proteasen und Zytokinen, sowie zur *de novo* Synthese von Zytokinen, Chemokinen und Lipid-Mediatoren [10, 11]. Durch zahlreiche

Arbeiten der letzten Jahre konnte gezeigt werden, dass MZ eine relevante Bedeutung im Rahmen der angeborenen und der erworbenen Immunität zukommt. Unter anderem spielen MZ aufgrund ihrer Lokalisation und ihrer zahlreichen Rezeptoren und Mediatoren eine große Rolle bei der Abwehr von Pathogenen. Beispielsweise können MZ über verschiedene Toll-like Rezeptoren (TLR) Komponenten von Bakterien (Lipopolysaccharide, Peptidoglykane) und Viren (Nukleinsäuren) direkt erkennen und durch die Freisetzung verschiedener Mediatoren eine schützende Immunantwort auslösen [12, 13]. So können MZ über CD48 auch Fimbrien tragende Bakterien erkennen, was zur Freisetzung von Tumornekrosefaktor (TNF) führt, das seinerseits Neutrophile rekrutiert, die die Bakterien bekämpfen [14, 15]. MZ können aber auch durch die Mediatoren Pathogen-induzierter Immunantworten aktiviert werden und deren Verlauf modulieren. MZ interagieren zum Beispiel mit Komponenten des Komplementsystems, das im Rahmen vieler Infektionen aktiviert wird. Insbesondere wurde dabei die Aktivierung von MZ durch die Komplement-Spaltprodukte C3a und C5a beschrieben [16]. Die Aktivierung der MZ durch Komplementfaktoren spielt eine entscheidende Rolle im murinen Modell der Sepsis, in dem MZ, durch die Freisetzung von TNF und die Rekrutierung von Neutrophilen, eine protektive Rolle zukommt [17, 18]. Ebenfalls indirekt ist die Aktivierung der MZ über Fc Rezeptoren [19]. Ein Beispiel sind Immunreaktionen zur Bekämpfung von Parasiten, an der MZ und IgE beteiligt sind [20–22]. MZ exprimieren jedoch neben dem hoch-affinen $Fc_\epsilon RI$ auch die beiden niedrig-affinen IgG Rezeptoren $Fc_\gamma RII$ und $Fc_\gamma RIII$ und den hoch-affinen IgG-Rezeptor $Fc_\gamma RI$, dessen Expression nach Stimulation mit Interferon γ (IFN- γ) hochreguliert ist [23–25]. Es konnte gezeigt werden, dass sogenannte Superantigene wie das Protein A von *Streptococcus aureus* MZ IgG- oder IgE- und IgG-abhängig aktivieren [26].

MZ sind jedoch nicht nur an der Detektion von Pathogenen und Allergenen und der Reaktion darauf beteiligt, sie beeinflussen auch zahlreiche physiologische und pathologische Prozesse. So ist beispielsweise der Zyklus aus Wachstums- und Ruhephasen der Haarfollikel in MZ-defizienten *Kit^W/Kit^{Wv}*-Mäusen gestört [27]. Des Weiteren sind MZ in der Wundheilung der Haut, der Restrukturierung von Knochen und der Angiogenese von Bedeutung [28–31]. Die Mitwirkung der MZ an Re- und Umstrukturierungsprozessen in Geweben spielt auch bei Fibrosen [32], rheumatoider Arthritis [33, 34] und allergischem Asthma [35, 36] eine Rolle. MZ beeinflussen zudem die Tumorgenese, wobei sie einerseits das Tumorstadium hemmen, andererseits jedoch auch begünstigen können [37]. Nicht zuletzt nehmen MZ eine protektive Rolle bei Schädigungen durch UV-Strahlung und Toxinen wie Bienen- oder Schlangengift ein [38, 39].

1.1.3 Ontogenie der Mastzellen

Mittels intensiver histologischer Untersuchungen konnten zwar sowohl die Morphologie als auch das Vorkommen und die Verteilung von MZ detailliert untersucht werden, jedoch blieb ihr tatsächlicher zellulärer Ursprung sehr lange Zeit ungeklärt. Erst etwa 100 Jahre nach der Beschreibung durch Paul Ehrlich gelang es Yukihiko Kitamura et al. nachzuweisen, dass murine Mastzellen nicht dem Bindegewebe entstammen, sondern aus hämatopoetischen Stammzellen im Knochenmark hervorgehen. Nach der Transplantation von Knochenmarkszellen von beige-Mäusen (C57BL/6-*bg^J/bg^J*) in bestrahlte Wildtyp-Mäuse (C57BL/6-*+/+*) kam es zur Ausbildung von MZ des auffälligen *beige*-Phänotyps in den adoptiv transferierten Tieren [40]. Auch in nicht-bestrahlten MZ-defizienten WBB6F₁-*W/W^v*-Mäusen kam es nach der Transplantation von Knochenmarkszellen aus WBB6F₁-*+/+*-Mäusen zur Anreicherung von MZ in den Geweben [41]. Später konnte nachgewiesen werden, dass auch im Blut MZ-Vorläuferzellen, die morphologisch nicht den ausgereiften MZ entsprechen, vorhanden sind [42]. Es wurde vermutet, dass MZ, anders als die meisten Zellen hämatopoetischen Ursprungs, ihre Differenzierung nicht im Knochenmark, sondern erst im peripheren Gewebe vollenden. Im Jahre 1996 gelang es Rodewald et al. tatsächlich im fötalen Blut der Maus direkte MZ-Vorläuferzellen (*mast cell committed progenitor*, MCP) zu identifizieren [43]. Jene Zellen wurden als Thy-1^{lo} c-kit^{hi} Fc_εRI⁻ charakterisiert und führten durch die Kultur mit Interleukin-3 (IL-3) und Stammzellfaktor (*stem cell factor*, SCF) zur Entstehung von MZ-Kolonien. Ein adoptiver Transfer dieser MCP in das Peritoneum von MZ-defizienten WBB6F₁-*W/W^v*-Mäusen führte zur Ausbildung peritonealer MZ in den Tieren. Neun Jahre nach dieser Entdeckung identifizierten Jamur et al. CD34⁺ CD13⁺ c-kit⁺ Fc_εRI⁻ Vorläuferzellen im Knochenmark adulter Balb/c-Mäuse, die sich ausschließlich zu MZ entwickelten [44]. Zur selben Zeit gelang es Chen et al. MCPs im Knochenmark adulter C57BL/6-Mäuse nachzuweisen [45]. Chen's Charakterisierung jener Zellpopulation als Lin⁻ c-kit⁺ Sca⁺ Ly6c⁻ Fc_εRI⁻ CD27⁻ β₇⁺ T1/ST2⁺ führte zum aktuellen Modell des Stammbaumes der hämatopoetischen Zellen, nach dem MZ entweder in direkter Linie von multipotenten Vorläufern (*multipotent progenitor*, MPP) oder von myeloiden Vorläuferzellen (*common myeloid progenitor*, CMP) abstammen (Abbildung 1). Franco et al. zeigten schließlich im Jahre 2010 mit ihrer detaillierten Charakterisierung der CMP als Sca-1^{lo} Lin⁻ c-kit⁺ CD27⁺ Flk-2⁻ und der Granulozyten/Makrophagen Vorläufer (*granulocyte/macrophage progenitor*, GMP) als Sca-1^{lo} Lin⁻ c-kit⁺ CD27⁺ Flk-2⁺ CD150^{-/lo}, dass die CMP und nicht die GMP das Potential zur Differenzierung zu MCP haben [46]. Damit bestätigten sie die Hypothese, nach der sich die MCP unabhängig von den Granulozyten und Makrophagen früh in der Hämatopoese entwickeln.

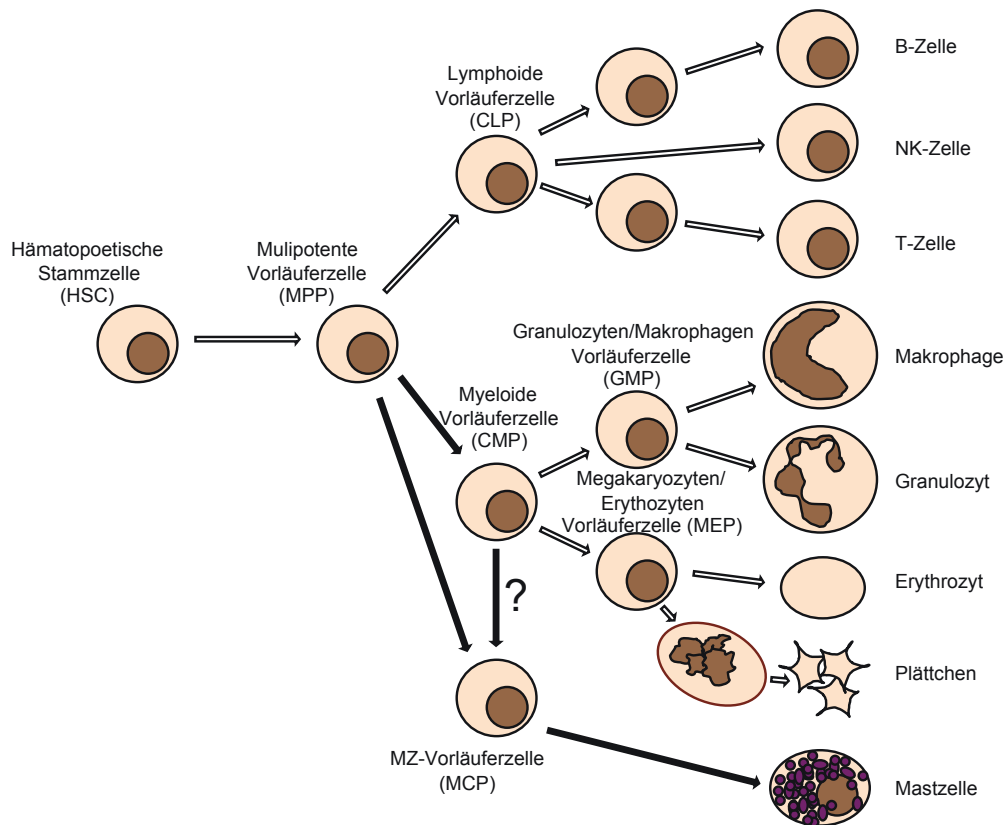


Abbildung 1: Stammbaum der Hämatopoese (modifiziert nach Chen et al. 2005 [45])

Nach dem derzeit aktuellen Konzept der Hämatopoese stammen die MZ-Vorläuferzellen (MCP) entweder direkt von den multipotenten Vorläuferzellen (MPP) oder auch den myeloiden Vorläuferzellen und entwickeln sich unabhängig von den Granulozyten/Makrophagen Vorläuferzellen (GMP).

1.1.4 Heterogenität der Mastzellen

Obwohl ausgereifte MZ eine sehr eindeutig charakterisierte Zellpopulation darstellen, weisen sie eine starke Heterogenität auf. Schon im Jahre 1895 äußerten sich Hardy und Westbrook über die Verschiedenartigkeit der Zellen in unterschiedlichen Geweben und Organismen [47]. Enerbäck stellte schließlich mit seiner Dokumentation ungleicher histochemischer Eigenschaften von MZ der intestinalen Mukosa und den Bindegeweben der Ratte das Konzept von der Heterogenität der MZ auf [48, 49]. Dies führte nach weitergehenden Untersuchungen zur Unterteilung der MZ in Subpopulationen aufgrund der Entdeckung zahlreicher verschiedener Charakteristika. Dabei sind unter anderem Unterschiede bezüglich der Morphologie (Größe, Granularität), der Lokalisation, der histochemischen Färbeeigenschaften, der Expression bestimmter Proteasen, des Histamingehaltes, des Sulfatierungsgrades der Proteoglykane, der Abhängigkeit von bestimmten Wachstumsfaktoren und der Aktivierbarkeit festgestellt worden. Murine MZ werden aufgrund der genannten Eigenschaften und ihrer Lokalisation in Bindegewebs-MZ (*connective tissue mast cells*, CTMC) und Schleimhaut-MZ (*mucosal mast cells*, MMC) unterteilt (Tabelle 1). Diese MZ Subpopulationen sind nicht endgültig auf den jeweiligen Phänotyp festgelegt. MZ können in

Abhängigkeit verschiedener organspezifischer Umgebungen transdifferenzieren [50, 51]. Humane MZ werden hingegen nicht nach ihrer Lokalisation, sondern anhand ihres Proteasegehaltes ebenfalls in zwei Subpopulationen eingeteilt. Dabei werden MZ, die sowohl Tryptase als auch Chymase enthalten, TC-MZ genannt, während Zellen, die nur Tryptase exprimieren, als T-MZ bezeichnet werden [52].

Tabelle 1: Phänotypische Eigenschaften muriner MZ Populationen

Eigenschaften	Schleimhaut-MZ	Bindegewebs-MZ	Quelle
Lokalisation	intestinale Mukosa, Epithelien von Trachea und Bronchien	Haut, Submukosa von Darm, Trachea und Bronchien, Skelettmuskulatur, seröse Oberflächen (z.B. Peritoneum)	[48, 53]
Morphologie	kleinere Zellen, Granula mit variabler Größe und unterschiedlicher Elektronendichte	größere Zellen, mehr Granula, gleichförmige Granula mit hoher Elektronendichte	[48, 54]
Lebensdauer	kurz (Halbwertszeit < 40 Tage)	lang (Halbwertszeit > 6 Monate)	[54, 55]
Proliferation			
T-Zell-abhängig	+	-	[56–58]
Fibroblastenabhängig	+	+	[58]
Färbeeigenschaften			
Alzianblau	+	+	[48, 49, 53]
Safranin	-	+	[48, 49, 53]
Berberinsulfat	-	+	[59]
Fixierung	Formalin-sensitiv	Formalin-resistent	[48, 49]
Produkte			
Glykosaminoglykan	Chondroitinsulfat	Heparin	[59–62]
MZ-spezifische Proteinasen			
Tryptasen	-	MCPT-6,-7	Übersicht [63]
Chymasen	MCPT-1,-2	MCPT-4,-5	Übersicht [63]
MZ-Carboxypeptidase A	-	+	Übersicht [63]
Histamin	1-2 µg/10 ⁶ Zellen	1-7 µg/10 ⁶ Zellen	[60–62]
Serotonin	+++	+	[11, 60]
Sekretagoga			
Substanz 48/80	-	+	[11, 62, 64]
IgE +Antigen	+	+	[60, 62]

1.2 Einwanderung der Mastzell-Vorläuferzellen in die Gewebe

Im Gegensatz zu den übrigen Leukozyten verlassen MZ das Knochenmark nicht als ausgereifte Zellen, sondern zirkulieren als MZ-Vorläuferzellen (MCP) im Blut. Die MCP werden spezifisch in die entsprechenden Gewebe rekrutiert, wo sie schließlich unter dem Einfluss der lokal vorhandenen Zytokine zu MZ differenzieren und ausreifen. Dabei ist die Einwanderung der MCP im Zusammenhang mit dem physiologischen Vorgang der Homöostase und die Rekrutierung im Rahmen pathologischer Prozesse (z.B. Entzündungsreaktionen) zu unterscheiden.

1.2.1 Beteiligung von Integrinen und Chemokinen bei Einwanderung unter physiologischen Bedingungen

Die Einwanderung der MCP aus dem Knochenmark in die peripheren Gewebe nachzuvollziehen, ist schwierig, da sie morphologisch nicht zu identifizieren sind (siehe Kapitel 1.1.3). Michael F. Gurish et al. konnten jedoch mittels *liming dilution analysis* unter Nachweis der Ausbildung von MZ-Kolonien *ex vivo* zeigen, dass das $\alpha_4\beta_7$ Integrin und dessen Ligand *Mucosal addressin cell adhesion molecule 1* (MadCAM-1) für die konstitutionelle Rekrutierung von murinen MCP in die Dünndarm-Schleimhaut essentiell sind [65, 66]. Weiterhin wiesen die Ergebnisse dieser Arbeit darauf hin, dass die konstitutive Rekrutierung von MCP gewebspezifisch geschieht, da die Anzahl der MCP in der Lunge durch die Blockierung von $\alpha_4\beta_7$ Integrin nicht reduziert wurde. Weiterführende Untersuchungen von Abonia et al. zeigten darüber hinaus, dass auch das *Vascular cell adhesion molecule 1* (VCAM-1) und der CXC Chemokinrezeptor 2 (CXCR2) für die Einnistung muriner intestinaler MCP relevant sind [67]. Wie die Einwanderung der MCP unter physiologischen Bedingungen in die anderen MZ-haltigen Gewebe, wie beispielsweise die Haut oder die Lunge, spezifisch vermittelt wird, ist bislang weitgehend unklar. Rosenkranz et al. konnten jedoch nachweisen, dass die Anzahl der MZ im Peritoneum und der Rückenhaut in $\alpha_M\beta_2$ -Integrin (*Macrophage-1 antigen*, Mac-1)-defizienten Mäusen verringert ist [68].

1.2.2 Beteiligung von Integrinen und Chemokinen Einwanderung im Rahmen pathologischer Prozesse

Bei einer Vielzahl von Erkrankungen, wie z.B. Neurofibromatose [69], diversen Karzinomen [70, 71], rheumatoider Arthritis [33, 34], Skleroderma [72], allergischem Asthma [35, 36] und bei der Abwehr von Parasiten [73], kann es zu einer starken Akkumulation von MZ in den betroffenen Geweben kommen. Auch hierbei sind die genauen Mechanismen der Vorläuferrekrutierung und der anschließenden Differenzierung zu MZ weitestgehend ungeklärt. Experimente mit den aus

Knochenmark generierten murinen MZ (*bone marrow-derived cultured mast cells*, BMCMC) als Modell für die MCP deuten an, dass die Extravasation der MCP bei der Einwanderung so wie die der Leukozyten ablaufen könnte. Intravenös injizierte BMCMC zeigen *in vivo* das sogenannte Rollen entlang des aktivierten Endothels, das zum Teil durch E- und P-Selektine, VCAM-1 und *Platelet/endothelial cell adhesion molecule 1* (PECAM-1) vermittelt wird [74].

Interessanterweise sind das Integrin $\alpha_4\beta_7$ und dessen Liganden VCAM-1 und MadCAM-1 nicht nur bei der Homöostase der intestinalen MZ entscheidend, sondern auch bei der Rekrutierung von MCP zur Ausbildung einer lokalen Mastozytose bei der Abwehr einer intestinalen Infektion durch Helminthen [66, 67]. In einem murinen Modell für allergische Atemwegserkrankungen konnte nachgewiesen werden, dass die Integrine $\alpha_4\beta_7$ und $\alpha_4\beta_1$ sowie deren Ligand VCAM-1, nicht jedoch MadCAM-1, an der Wanderung von MCP in die entzündete Lunge maßgeblich beteiligt sind [75, 76]. Auch der Chemokinrezeptor CXCR2 ist für die Rekrutierung von MCP unter pathologischen Bedingungen von Bedeutung. Allerdings wird bei genauerer Betrachtung auch hier die Gewebsspezifität deutlich. Bei der Einwanderung von MCP in den durch Helminthen infizierten Dünndarm ist die CXCR2 Expression auf den MCP entscheidend [67]. Die Rekrutierung der MCP in die entzündete Lunge scheint hingegen eher von der Expression des CXCR2 auf den Stromazellen der Lunge abzuhängen [76].

An der Einwanderung von MZ im Rahmen von Entzündungen ist wahrscheinlich ein weiterer Chemokinrezeptor, der CXCR3, beteiligt. Synoviale MZ von Patienten mit rheumatoider Arthritis exprimieren CXCR3, und in den betroffenen synovialen Geweben sind die CXCR3 Liganden CXCL9 und CXCL10 nachweisbar [77]. Des Weiteren weisen MZ in der glatten Atemwegsmuskulatur von Asthmapatienten eine erhöhte Expression von CXCR3 im Vergleich zu nicht Betroffenen auf. Auch produziert die glatte Muskulatur der Atemwege betroffener Patienten vermehrt den CXCR3 Liganden CXCL10 [78]. Zusammengefasst verdeutlichen diese Arbeiten, dass die Einwanderung der MCP unter Beteiligung von Adhäsionsmolekülen und Chemokinrezeptoren gewebeabhängig und situationsbedingt sehr komplex reguliert wird.

1.3 Differenzierung der Mastzellen

Wie unter 1.1.3 bereits erläutert, reifen MCP nach der Einwanderung lokal unter dem Einfluss der gewebespezifischen Zytokine zu MZ aus. Dabei entwickeln sich, in Abhängigkeit vom umgebenen Gewebe (z.B. Dermis, Magenschleimhaut, Darmepithel) und den lokal vorhandenen Wachstumsfaktoren und Zytokinen (vgl. Abbildung 2), phänotypisch sehr unterschiedliche MZ (MZ-Heterogenität, vgl. Kapitel 1.1.4).

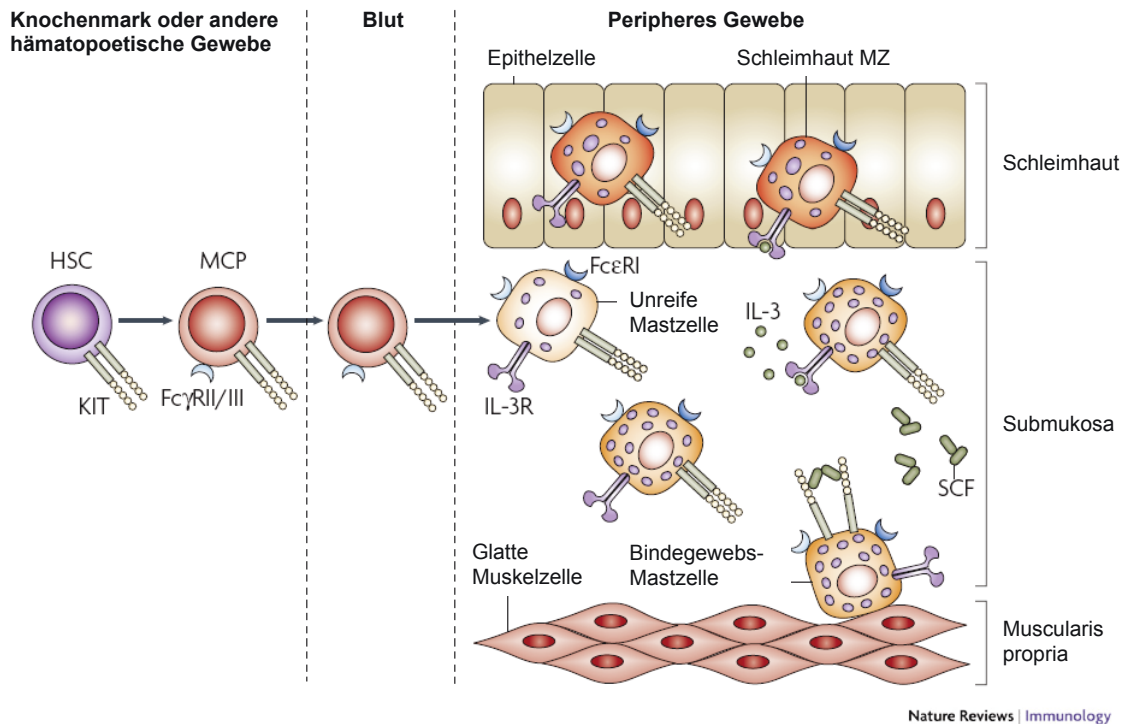


Abbildung 2: Entwicklung von Mastzellen und Verteilung in Geweben

Gewebsständige MZ entwickeln sich aus MZ-Vorstüfern (MCP), die aus hämatopoetischen Stammzellen (HSC) entstehen. MCP erreichen über den Blutkreislauf die peripheren Gewebe, wo sie differenzieren und zu MZ ausreifen. Neben dem essentiellen Überlebensfaktor Stammzellfaktor (SCF) sind weitere Faktoren für die gewebsspezifische Differenzierung von Bedeutung. Beispielsweise beeinflusst die Anwesenheit von Zytokinen wie Interleukin-3 (IL-3) die Proliferation und den Phänotyp der MZ im Gewebe. Zum Beispiel befinden sich Schleimhaut-MZ in der Schleimhaut (Mukosa) des Darms, Bindegewebs-MZ hingegen in der Submukosa und in der Muscularis propria. FcεRI, hoch-affiner Fc Rezeptor für IgE; FcγRII/III, niedrig-affine Fc Rezeptoren für IgG; IL-3r, IL-3 Rezeptor. Nachgedruckt und ins Deutsche übersetzt mit Genehmigung von Macmillan Publishers Ltd: Nature Reviews Immunology (2008 Jun;8(6):478-86), copyright (2008); <http://www.nature.com/nri/index.html>.

1.3.1 Zytokine bei der Entwicklung von Mastzellen

1.3.1.1 Stammzellfaktor

Die murinen MZ-Subpopulationen, MMC und CTMC, sind vom Wachstumsfaktor Stammzellfaktor (*stem cell factor*, SCF) abhängig. SCF wird auch als Kit-Ligand (KL), *mast cell growth factor* (MGF) oder *steel factor* (SLF) bezeichnet und ist im *Steel* (Sl) Genlocus codiert [79–82]. Er ist der Ligand der Rezeptor-Tyrosinkinase Kit. Kit ist das Produkt des Protoonkogens *c-kit* (*kit*), das als “*cellular homolog of the feline sarcoma viral oncogene v-kit*” entdeckt wurde [83] und im “*dominant-white spotting*” (W) Locus der Maus codiert ist [84, 85]. Das Fehlen von Kit oder SCF führt bereits *in utero* oder perinatal zum Tod aufgrund schwerer Anämie [86]. Es wurden zahlreiche funktionseinschränkende Mutationen in beiden Genloki (W und Sl) mit verschiedensten Effekten auf die Pigmentierung, die Hämatopoese und die Gametogenese beschrieben [87, 88]. Doch erst die Entdeckung der MZ-Defizienz von WBB6F₁-W/W^v- und WCB6F₁-Sl/Sl^d-Mäusen

durch Kitamura et al. wies auf die Relevanz beider Genprodukte für die MZ-Genese hin [41, 89]. SCF spielt in vielen Aspekten der MZ-Biologie eine Rolle. Beispielsweise wirkt SCF auf MZ als Chemoattraktant *in vitro* [30] sowie als Überlebensfaktor *in vitro* und *in vivo* [90–93]. Des Weiteren kann SCF selbst zur Aktivierung der MZ führen und die IgE-abhängige Aktivierung der MZ verstärken [94–96]. Darüber hinaus sind SCF/Kit-Interaktionen an der Adhäsion von MZ an Matrixproteine und Fibroblasten (Fb) beteiligt [97–99]. SCF induziert die Expression von MCPT-4 in BMCMC, verstärkt die Produktion von Histamin und Heparin und bewirkt somit die Differenzierung zum Phänotyp der CTMC [100, 101]. *In vivo* führt die Injektion von rekombinantem SCF zur Akkumulation von MZ in den direkt behandelten Organen bzw. Geweben [81, 101]. Doch auch die intravenöse Applikation von SCF führt in verschiedenen Geweben zur Vermehrung der MZ, wobei diese phänotypisch nicht homogen sind, sondern gemäß ihrer Lokalisation den CTMC bzw. den MMC entsprechen [101].

Es existieren zwei Isoformen von SCF, die durch alternatives Splicing entstehen [102]. Die erste SCF Isoform ist ein Glykoprotein aus 248 Aminosäuren (SCF²⁴⁸, KL-1, 45 kD) und wird membranständig exprimiert. Eine proteolytische Schnittstelle, codiert in Exon 6, ermöglicht die Freisetzung als lösliches SCF (sSCF, 165 Aminosäuren, 31 kD) durch diverse Proteasen [103–105]. Die zweite Isoform, SCF²²⁰ (KL-2, 220 Aminosäuren, 32 kD), wird ebenfalls als membranständiges Protein exprimiert. Ihr fehlen die in Exon 6 codierten Aminosäuren und damit auch die proteolytischen Schnittstellen. SCF²²⁰ verbleibt somit meist membrangebunden und wird daher auch als membranständiges SCF (mSCF) bezeichnet. SCF besitzt eine weitere proteolytische Schnittstelle, codiert in Exon 7, die nur geschnitten wird, wenn die primäre Schnittstelle (Exon 6) nicht vorhanden ist [104] (vgl. Abbildung 3). Beide, die lösliche und die membranständige Variante von SCF, sind biologisch aktiv, wobei letztere eine länger anhaltende Aktivierung von Kit auslöst [106, 107]. Die Expression von SCF wurde *in vitro* unter anderem in Epithelzellen, Myofibroblasten, Endothelzellen und Fibroblasten nachgewiesen [105]. Huang et al. zeigten, dass die beiden SCF-Isoformen von verschiedenen Zellen und Geweben in unterschiedlichen Verhältnissen exprimiert werden [79]. Der SCF-Rezeptor Kit wird unter anderem von hämatopoetischen Stammzellen, myeloiden Vorläuferzellen, pro-B und pro-T Zellen, Melanozyten und MZ exprimiert [108]. Kit ist eine Typ III Rezeptor-Tyrosinkinase mit einer extrazellulären Liganden-Bindungsdomäne, einer Transmembrandomäne und einer cytoplasmatischen Kinasedomäne [109]. Die Bindung des Liganden SCF führt zur Rezeptor-Dimerisierung, was durch die Autophosphorylierung der Tyrosinreste die Aktivierung der Kinaseaktivität und damit schließlich die Signaltransduktion auslöst [110, 111].

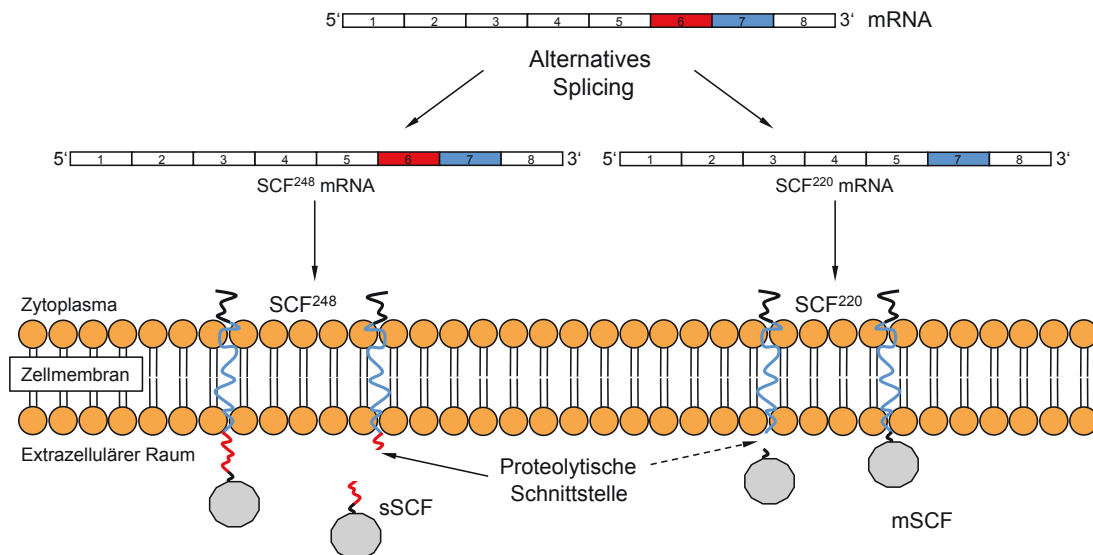


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Entstehung der beiden Isoformen von SCF durch Alternatives Splicing (modifiziert nach Reber et al. [79])

Durch Alternatives Splicing des 6. Exons der mRNA entstehen zwei Isoformen von SCF. Beide Isoformen SCF²⁴⁸ und SCF²²⁰ werden membranständig exprimiert. SCF²⁴⁸ kann durch Proteasen in der proteolytischen Schnittstelle, die durch Exon 6 codiert ist, geschnitten werden. Das führt zur Freisetzung des löslichen sSCF (165 Aminosäuren). SCF²²⁰ wird auch als membrangebundenes SCF (mSCF) bezeichnet, da ihm die proteolytische Schnittstelle fehlt. Möglicherweise kann es an einer alternativen Schnittstelle geschnitten werden, welches durch den gestrichelten Pfeil angedeutet wird.

1.3.1.2 Interleukin-3

IL-3 ist ein Wachstumsfaktor, der das Überleben und die Proliferation von multipotenten Vorläuferzellen sowie hämatopoetischen Zellen der myeloiden und lymphoiden Linien stimuliert [112]. Seit 1981 ist bekannt, dass murine MZ *in vitro* durch die Kultur von hämatopoetischen Zellen in konditioniertem Medium generiert werden können, welches durch stimulierte T-Zellen oder eine murine Lymphomzelllinie (WEHI-3B) angereichert wurde [113–115]. Später wurde nachgewiesen, dass das darin enthaltene IL-3 sowohl die Proliferation als auch die Differenzierung der MZ induziert [116, 117]. *In vivo* ist das T-Zell-abhängige Wachstum ein entscheidender Unterschied der MMC zu den CTMC. Während die Anzahl dermalen CTMC in der Haut von athymischen Mäusen mit der von Wildtyp-Mäusen übereinstimmt, ist die Anzahl intestinaler MMC in T-Zell-depletierten Mäusen dramatisch verringert [56, 57]. Mittels Antikörper gegen IL-3 sowie anhand von IL-3^{-/-}-Mäusen konnte nachgewiesen werden, dass IL-3 an der Induktion der MZ-Hyperplasie im Zuge einer Nematoden-Infektion (*Nippostrongylus brasiliensis* bzw. *Strongyloides venezuelensis*) beteiligt ist [118, 119]. Auf die MZ-Homöostase hat IL-3 offenbar keinen entscheidenden Einfluss, denn IL-3^{-/-}-Mäuse unterscheiden sich bezüglich der MZ-Zahlen nicht vom Wildtyp [119]. *In vitro* jedoch unterstützt IL-3 die Entwicklung und das Überleben von murinen MZ, unabhängig von SCF [116, 117, 120, 121]. Für die Entwicklung und das Überleben humaner MZ ist IL-3 nicht ausreichend, deren Entwicklung ist SCF-abhängig [122].

1.3.1.3 Weitere Zytokine

Neben SCF und IL-3 haben weitere Zytokine und Wachstumsfaktoren Einfluss auf die Differenzierung, Reifung und Proliferation von MZ. So sind IL-3 und IL-4 für die *ex vivo* Proliferation von peritonealen murinen MZ notwendig, die phänotypisch den CTMC entsprechen [123, 124]. BMCMC hingegen proliferieren durch IL-3 allein, jedoch stärker, wenn zusätzlich auch IL-4 im Kulturmedium ist [125]. Dagegen ist die SCF-abhängige Proliferation von BMCMC durch IL-4 verringert, da es die Expression von Kit herunterreguliert [126].

Weder die Stimulation mit IL-9 allein noch in Kombination mit SCF hat einen Einfluss auf die Proliferation der BMCMC. Jedoch erhöht die Kultur mit IL-9 plus SCF die Lebensdauer der BMCMC und führt zur gesteigerten mRNA-Expression der Proteasen MCPT-1 und MCPT-2, was einer Differenzierung zum Phänotyp der MMC entspricht, die durch IL-3 oder IL-4 gehemmt wird [127].

IL-10 induziert ebenfalls die Expression von MCPT-1 und -2 in BMCMC, die durch IL-3 reduziert wird [128, 129]. Zudem verstärkt IL-10 die Proliferation von MZ-Linien und MZ-Vorläufern, jedoch nur in Kombination mit IL-3 oder IL-4 [130]. Während die Entwicklung von murinen MZ-Vorläufern durch IL-4 gehemmt wird, induziert IL-6 sie, in Kombination mit TNF und IL-3 oder mit SCF und IL-10 [131, 132].

Auch Zytokine, die nicht zu den Interleukinen gehören, beeinflussen die Entwicklung von MZ. Zum Beispiel verstärkt *Nerve growth factor* (NGF) die IL-3-abhängige Proliferation von BMCMC und induziert darüber hinaus deren Differenzierung in Richtung CTMC [133]. *Transforming growth factor* β (TGF- β) hingegen hemmt die IL-3-abhängige Proliferation von BMCMC und induziert die Expression von MCPT-1, was für eine Differenzierung zu MMC spricht [134].

1.3.2 Murine *in vitro*-Mastzell-Modelle

Es gibt verschiedene *in vitro*-Modelle zur Untersuchung von MZ. Peritoneale kultivierte MZ (*peritoneal cultured mast cell*, PCMC), welche durch die Kultivierung peritonealer Zellen mit SCF und IL-3 gewonnen werden sowie direkt aus dem Peritoneum (*peritoneal mast cell*, PMC) oder aus der Haut isolierte MZ, dienen beispielsweise als Modelle für CTMC [135–137]. Ebenfalls eine bedeutende Rolle in der MZ-Forschung spielen BMCMC. Es handelt sich dabei um MZ, die mit Hilfe von IL-3 in großer Anzahl und hoher Reinheit aus Knochenmarkzellen generiert werden [113–117]. BMCMC werden aufgrund verschiedener Merkmale als *in vitro*-Modell unreifer MZ angesehen. Die Granula von BMCMC lassen sich mit Alzian Blau anfärben, nicht jedoch mit Safranin, da sie hauptsächlich das Chondroitinsulfat E und nicht Heparansulfat enthalten [117].

Des Weiteren produzieren BMCMC verhältnismäßig geringe Mengen Histamin, Serinproteasen und MC-CPA und sind nur schwach granuliert [138–140]. Murine BMCMC exprimieren weder die Serinprotease MCPT-2, welche als später Differenzierungsmarker der MMC gilt, noch die MCPT-4, ein später Differenzierungsmarker der CTMC [100, 141]. BMCMC haben *in vitro* unter dem Einfluss verschiedener Zytokine (vgl. Kapitel 1.3.1) und *in vivo* das Potential sowohl zu MMC als auch zu CTMC zu differenzieren [120]. Wie im nachfolgenden Kapitel 1.3.4 näher erläutert, kommt es auch durch die Kultivierung mit Fibroblasten (Fb) zur Differenzierung der BMCMC zu MZ des CTMC Phänotyps.

1.3.3 Mausmodelle mit Mutationen in Kit

In der MZ-Forschung werden verschiedene Mausstämme genutzt, die bedingt durch natürliche Mutationen MZ-defizient sind. Die am besten charakterisierten und am häufigsten untersuchten MZ-defizienten Mausstämme sind die WBB6F1-*Kit*^{W/W^v}- und die C57BL/6-*Kit*^{W-sh/W-sh}-Mäuse [41]. WBB6F1-*Kit*^{W/W^v}-Mäuse tragen zwei verschiedene Mutationen in *kit*, was zur Expression eines funktionell stark eingeschränkten SCF-Rezeptors führt. Die W-Mutation, eine Deletion von 234 Nukleotiden, bedingt den Verlust der Transmembrandomäne am N-Terminus von Kit [142]. Das W^v-Allel hingegen trägt eine Punktmutation in der Kinasedomäne und ist in der Tyrosinkinaseaktivität sehr stark eingeschränkt [142, 143]. Durch diese Einschränkung der Aktivität der Tyrosinkinase Kit kommt es unter anderem zur Melanozyten- und MZ-Defizienz, zur Anämie und Sterilität der betroffenen Tiere [41, 86, 87]. C57BL/6-*Kit*^{W-sh/W-sh}-Mäuse sind homozygot für eine Inversionsmutation im regulatorischen Bereich von *kit* [144, 145]. Diese führt zur fehlenden Expression der Tyrosinkinase in MZ und Melanozyten, wodurch die Melanogenese beeinträchtigt und die MZ-Defizienz der Tiere verursacht werden [144, 146, 147]. C57BL/6-*Kit*^{W-sh/W-sh}-Mäuse sind im Gegensatz zu den WBB6F1-*Kit*^{W/W^v}-Mäusen nicht anämisch und nicht steril, welches für Experimente von Vorteil sein kann [146].

Trotz der MZ-Defizienz in beiden hier aufgeführten Mausstämmen ist es möglich, aus den Knochenmarkzellen oder Milzzellen der Tiere mittels der Kultur mit IL-3 MZ zu generieren, da die Anzahl der MZ-Vorläufer in deren Knochenmark nicht verändert ist [121, 148, 149].

So konnte gezeigt werden, dass MZ, die *in vitro* aus Milzzellen oder dem Knochenmark von C57BL/6-*Kit*^{W-sh/W-sh}-Mäusen generiert wurden, *kit* nicht exprimieren [144, 149]. Daraus geht hervor, dass sich *Kit*^{W-sh/W-sh}-BMCMC dazu eignen, die Bedeutung von Kit bei der Differenzierung und Proliferation vom MZ *in vitro* zu untersuchen.

1.3.4 Die Differenzierung von MZ durch die Cokultur mit Fibroblasten

Schon 1967 stellten Ginsburg et al. fest, dass embryonale Fb *in vitro* die Entwicklung von MZ unterstützen [150]. 1982 zeigten Davidson et al., dass *in vitro* zwar die MZ-Differenzierung von Vorläuferzellen aus murinen Lymphknoten durch IL-3 ausgelöst wird, die Reifung der Granula, charakterisiert durch Histaminanreicherung, jedoch von Fb abhängt [151]. Levi-Schaffer et al. zeigten wenige Jahre später, dass die Cokultur mit Fb der Zelllinie Swiss albino 3T3 zu einem den CTMC Phänotyp von peritonealen MZ erhält und zum anderen die Proliferation von IL-3-abhängigen BMCMC sowie deren Differenzierung zu MZ des CTMC-Phänotyps auslöst [152, 153]. Im Detail kam es dabei zu einer starken Steigerung des Histamingehaltes der kokultivierten BMCMC und zur Anreicherung von Heparin in deren Granula. Serafin et al. entdeckten, dass die Cokultur mit Fb zur verstärkten Expression von MC-CPA führt, welches ebenfalls ein Merkmal von CTMC darstellt [141]. Später konnte nachgewiesen werden, dass die Cokultur mit Fb auch zu Veränderungen bezüglich der Aktivierung von MZ führt. So ist die prozentuale Freisetzung von Histamin, Leukotrien B₄ (LTB₄), Leukotrien C₄ (LTC₄) und Prostaglandin D₂ (PDG₂) nach Aktivierung mit IgE und Antigen von MZ, die mit Fb kokultiviert wurden, deutlich erhöht [154]. Diesbezüglich gab es jedoch Unterschiede zwischen den adhärenen kokultivierten MZ und den nicht-adhärenen kokultivierten MZ. Während der Histamingehalt und die Heparinsynthese in beiden Populationen gleichermaßen induziert wurden, konnte die verstärkte Freisetzung der Lipidmediatoren LTB₄, LTC₄ und PDG₂ nur bei den ersteren festgestellt werden. Dies führte zu der Vermutung, dass eine spezifische Rezeptor-Liganden-Bindung der BMCMC an die Membranmoleküle der Fb für die gesteigerte Freisetzung verantwortlich sein könnte [154].

Fujita et al. wiesen in einer Reihe von Arbeiten nach, dass der Kontakt zu Fb, unabhängig von IL-3, die Proliferation und Heparinsynthese von BMCMC induziert [148, 155, 156]. Zudem wiesen sie nach, dass diese Effekte sehr wahrscheinlich von Kit und SCF abhängig sind, denn WBB6F-1-*Kit*^{W/W^v}-BMCMC proliferierten nach Kontakt mit Fb nicht und synthetisieren kein Heparin, im Gegensatz zu Wildtyp-BMCMC [148, 155]. Auch induzierte die Cokultur von BMCMC mit WCB6F-*Sl/Sl^d*-Fb nicht die IL-3-unabhängige Proliferation und Heparinsynthese von BMCMC, sondern hemmte sogar deren IL-3-induzierte Proliferation [156, 157]. Wie bereits in Kapitel 1.3.1.1 beschrieben, wurde nachgewiesen, dass rekombinantes SCF die Differenzierung und Proliferation von MZ auslöst. Dies legt nahe, dass SCF tatsächlich der entscheidende Faktor bei der Differenzierung von MZ durch Fb ist. Matsuda et al. konnten zeigen, dass auch NGF für die Fb-induzierte MZ-Differenzierung verantwortlich sein könnte, allerdings nur wenn IL-3 im Medium enthalten ist, da NGF von den Fb in der Cokultur ohne IL-3 nicht freigesetzt wird [158].

Des Weiteren führt der Zusatz von Zytokinen wie IL-1 α , IL-6, IL-11, Onkostatin M, und *Leukemia inhibitory factor* zu einer verstärkten MZ-Proliferation, während der Cokultur mit Fb [159–161]. In einer MZ/Fb-Cokultur wirken MZ auch auf die Fb. MZ können eine gesteigerte Proliferation und eine verstärkte Produktion von extrazellulären Matrixproteinen durch Fb auslösen [162]. Takano et al. modifizierten daher die Cokultur aus BMCMC und Fb, indem sie die Fb vor der Zugabe der BMCMC mit Mitomycin behandelten, um relativ konstante Kulturbedingungen zu gewährleisten [163]. Die Untersuchung der auf diese Weise kokultivierten BMCMC mittels Microarray zeigte die Hochregulierung der Expressionslevel zahlreicher Gene, die mit der Differenzierung zu MZ des CTMC-Phänotyps assoziiert sind. In einer darauf folgenden Arbeit konnten Takano et al. eine Beteiligung des Hyaluronrezeptors CD44 an der durch Fb induzierten MZ-Proliferation nachweisen [164]. Doch die genauen Mechanismen der Fb-induzierten MZ-Differenzierung sind bis heute nicht verstanden.

1.3.5 Regulation der Mastzell-Zahlen im Gewebe

Trotz der umfangreichen Kenntnisse zur Wirkung von Zytokinen und Fb auf die Erhaltung, Proliferation und Differenzierung von MZ (vgl. Kapitel 1.3.1) blieb bis heute ungeklärt, wie die Zahl und Verteilung der MZ in peripheren Geweben, beispielsweise der Haut, reguliert wird. Unter normalen physiologischen Bedingungen ist die Anzahl der MZ in den Geweben relativ konstant, kann jedoch im Rahmen von pathophysiologischen Prozessen (siehe auch Kapitel 1.2.2) sehr schnell und stark ansteigen [165]. Hierbei ist anzunehmen, dass die MZ-Homöostase von der Lebensdauer der Gewebe-MZ sowie der Einwanderung und anschließenden Differenzierung von Vorläuferzellen abhängt. Die Proliferation der lokalen ausgereiften MZ ist unwahrscheinlich. Denn obschon ausgereifte MZ *in vitro* und *in vivo* das Potential zur Proliferation besitzen, konnte *in vivo* sowohl unter physiologischen als auch unter pathologischen Bedingungen nur selten eine Proliferation der MZ in peripheren Geweben nachgewiesen werden [55, 166, 167]. Dies weist darauf hin, dass die Einwanderung und lokale Differenzierung von MZ-Vorläufern vermutlich der vorrangige Mechanismus bei der Vermehrung der Gewebs-MZ ist.

Murine Hautmastzellen reifen bereits vor der Geburt aus. Sie sind ab Tag 15 der Embryonalentwicklung im subkutanen Gewebe histologisch nachweisbar [168, 169]. Wenn MZ-Vorläufer die Dermis besiedeln, erhalten sie direkten Kontakt zu dermalen Fb, die den MZ-Wachstumsfaktor SCF in membrangebundener und löslicher Form (vgl. Kapitel 1.3.1.1) exprimieren [98]. Die Tatsache, dass BMCMC sowohl durch die Kultur mit rekombinantem SCF als auch durch Cokultur mit Fb zu CTMC ausreifen, lässt vermuten, dass von Fb exprimiertes SCF der entscheidende Faktor bei der Differenzierung von MCP und unreifen MZ zu reifen

Haut-MZ ist. Da die intravenöse Injektion von SCF zur Vermehrung von CTMC und MMC in den jeweiligen Geweben führt, kann angenommen werden, dass zusätzliche Faktoren von den Haut-Fb exprimiert werden, die für die Entwicklung von Haut-MZ mit dem CTMC-Phänotyp verantwortlich sind [101].

1.4 Ziele der Arbeit

Ziel dieser Arbeit war es, durch die nähere Untersuchung der Fibroblasten (Fb)-induzierten Proliferation und Differenzierung von Mastzellen (MZ), neben der Charakterisierung der Effekte der Fb auf die MZ, insbesondere den Mechanismus der MZ/Fb-Interaktion genauer zu charakterisieren. Dabei sollten Signalwege identifiziert werden, die möglicherweise als therapeutische Ziele verwendet werden können, um den Phänotyp bzw. die Anzahl von MZ in peripheren Geweben zu modulieren. Dies ist von Belang, da MZ wichtige Effektorzellen des adaptiven und des angeborenen Immunsystems sind, die im Rahmen zahlreicher Erkrankungen, deren Verläufe sie positiv bzw. negativ beeinflussen können, von Bedeutung sind. Die Anzahl der MZ kann in den betroffenen Geweben stark ansteigen, wogegen sie unter normalen physiologischen Bedingungen relativ konstant ist. Dabei ist die Einwanderung und die lokale Differenzierung von MZ-Vorläufern vermutlich der vorrangige Mechanismus. Da die Vorläufer dermalen MZ nach ihrer Einwanderung direkten Kontakt zu dermalen Fb erhalten, ist der entscheidende Einfluss der Fb auf die Differenzierung und Ausreifung dieser Vorläufer zu MZ naheliegend. Viele Arbeiten führten die Fb-induzierten Effekte auf den MZ-Phänotyp hauptsächlich auf den von Fb exprimierten Wachstumsfaktor Stammzellfaktor (SCF) zurück. Da SCF aber je nach Gewebe die Entwicklung verschiedener MZ-Phänotypen fördert, exprimieren Fb sehr wahrscheinlich weitere Faktoren, die für die Mastzell-Differenzierung entscheidend sind. Diese Hypothese zu überprüfen, die entsprechenden Mechanismen und gegebenenfalls die entscheidenden Signalwege zu identifizieren, waren der Kern dieser Arbeit.

2 Material

2.1 Geräte

Gerät	Modell	Hersteller
Autoklav		MELAG, Berlin, Deutschland
CO ₂ -Brutschrank	HeraCell 150	Heraeus, Hanau, Deutschland
Digitalkamera	Axio Cam	Carl Zeiss, Jena, Deutschland
Durchflusszytometer	FACSCalibur	BD, Heidelberg, Deutschland
Elektronische Waagen	LA 4200 und PT120	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Elektronische Pipette	Handy Step [®]	Brandt GmbH & Co, Wertheim, Deutschland
Elektrophoresekammern	Sub-Cell GT [®] , Mini Sub-Cell	BioRad, München, Deutschland
Fluoreszenzmikroskop	Axioplan2	Carl Zeiss, Jena, Deutschland
Gel-Dokumentationsgerät	GENE GENIUS	SYNGENE, Cambridge, UK
Gewebeeinbettautomat	Shandon Citadel [™] 1000	Thermo Fisher Scientific, Walldorf, Deutschland
Invers-Mikroskop	CKX 41	Olympus, Hamburg, Deutschland
LightCycler [®] 1.5 Instrument	1.5 Instrument	Roche, Mannheim, Deutschland
Magnet	EasySep [®] Magnet	Stem Cell Technologies, Grenoble, Frankreich
Magnetrührer	MR Hei-Mix L	Heidolph, Schwabach, Deutschland
Mehrkanalpipette	5 µl - 50 µl, 50 µl - 300 µl	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Mikroskopkamera	Axio Cam HRc	Carl Zeiss, Jena, Deutschland
Mikrotom	Shandon Finesse 325	Thermo Fisher Scientific, Walldorf, Deutschland
Mikrowelle		Bosch, München, Deutschland
Netzgerät	Power Pac 300	BioRad, München, Deutschland
Orbital-Schwenker	VIBRAMAX 100	Heidolph, Schwabach, Deutschland
Paraffin-Einbettstation	Shandon Histocentre 2	Thermo Fisher Scientific, Walldorf, Deutschland
Paraffin-Streckbad	GFL-1052	Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel, Deutschland
pH-Meter	PB-11	Sartorius, Göttingen, Deutschland

Gerät	Modell	Hersteller
Pipettierhilfe	pipetus®	Hirschmann® Laborgeräte, Eberstadt, Deutschland
Pipetten	2 µl, 10 µl, 20 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl	Brandt GmbH & Co, Wertheim, Deutschland; Eppendorf, Hamburg, Deutschland; Gilson, Middleton, USA
Plattenphotometer	Dynex MRX Version 1.33	Dynex Technologies, Chantilly, USA
Präparierbesteck	verschiedene Scheren, verschiedene Pinzetten	Aesculab B. Braun, Tuttlingen, Deutschland
Sterilbank	Typ LFV 12	Schulz Lufttechnik GmbH, Burladingen, Deutschland
Thermocycler	Master Cycler Gradient	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Thermocycler	Primus 96 Plus, Primus	MWG-BIOTECH, Ebersberg, Deutschland
Thermodrucker	UP-D895	Sony, Deutschland
Thermomixer	MTP	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Trockenschrank	Hera Cell	Heraeus, Hanau, Deutschland
Tischzentrifugen	Fresco 21 Centrifuge Eppendorf 5417R	Heraeus, Hanau, Deutschland Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Vortexer	Model 72020	NeoLab, Heidelberg, Deutschland
Wasserbad	WBT 222	Medingen, Dresden, Deutschland
Zählkammer (Neubauer-improved)	Tiefe 0,1 mm; Großquadrat 1 mm ²	Marienfeld, Lauda Königshofen, Deutschland
Zentrifuge	Megafuge 1.0 ST R	Heraeus, Hanau, Deutschland

2.2 Chemikalien und Reagenzien

Die Synthese aller verwendeten Oligonukleotide erfolgte durch die Firma TIB MOLBIOL GmbH Berlin, Deutschland.

Chemikalie / Reagenzie	Hersteller
2-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
α-Monothioglycerol	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
LE-Agarose (Electrophoresis Grade)	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Deutschland

Chemikalie / Reagenzie	Hersteller
Aqua ad iniectabilia	Braun, Melsungen, Germany
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt, Deutschland
Bovines Serum Albumin (BSA)	Serva, Heidelberg, Deutschland
Dimethylformamid (DMF)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
dNTPs	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Essigsäure	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Ethanol unvergällt (99 %)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ethanol vergällt (99 %)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ethidiumbromid (EtBr)	Invitrogen
FACSFlow	BD Pharmingen, San Diego, USA
Giemsas Azur Eosin-Methylenblau	Merck, Darmstadt, Deutschland
Glycerol	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
D-Biotinyl- ϵ -Aminocaprinsäure-N-Hydroxysuccinimidester (Biotin)	Roche, Mannheim, Deutschland
Isofluran (Forene)	Abbott, Baar, Schweiz
Methanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumhydroxid (NaOH)	Merck, Darmstadt, Deutschland
<i>Organo/Limonene-Mount</i> TM	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Paraffin	Merck, Darmstadt, Deutschland
Paraformaldehyd	Merck, Darmstadt, Deutschland
PBS mit Ca ²⁺ und Mg ²⁺	PAA, Pasching, Österreich
PBS ohne Ca ²⁺ und Mg ²⁺	PAA, Pasching, Österreich
<i>RNAprotect</i> [®] Cell Reagent	Qiagen, Hilden, Deutschland
<i>Standard Molecular Weight marker XIII</i>	Roche, Mannheim, Deutschland
Streptavidin-Cy3	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
TAE (50x)	Gibco, Life Technologies, Carlsbad, USA
Trypsin 0,5 Gew./Vol. %/ EDTA (0,22 Gew./Vol. %)	PAA, Pasching, Österreich
Trypanblau-Lösung (0,4 %)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Tween-20	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Tris-Acetat-EDTA-Puffer (TAE-Puffer), 50-fach konzentriert	Gibco, Life Technologies, Carlsbad, USA
Wasser, steril	Braun, Melsungen, Germany
Xylol	Merck, Darmstadt, Deutschland

2.3 Antikörper

Alle hier aufgeführten Antikörper sind spezifisch gegen Maus-Antigene gerichtet.

Antigen	Isotyp	Klon	Konjugat	Hersteller
beta7	RIgG _{2a}	M293	PE	BD Pharmingen, Heidelberg, Deutschland
beta7	RIgG _{2a}	FIB27	unmarkiert	BD Pharmingen, Heidelberg, Deutschland
CD11b	RIgG _{2b}	M1/70	PE	BD Pharmingen, Heidelberg, Deutschland
CD29	AHIgG ₁	HMß1-1	Biotin	BioLegend, San Diego, USA
CD29	AHIgG ₁	HMß1-1	unmarkiert	BioLegend, San Diego, USA
CD31	RIgG _{2b}	MEC 13.3	PE	BD Pharmingen, Heidelberg, Deutschland
CD49d	RIgG _{2b}	R1-2	PE	BD Pharmingen, Heidelberg, Deutschland
CD49d	RIgG _{2b}	R1-2	unmarkiert	BD Pharmingen, Heidelberg, Deutschland
CD51	RIgG ₁	RMV-7	PE	BD Pharmingen, Heidelberg, Deutschland
CD54	RIgG ₁	3E2	PE	BD Pharmingen, Heidelberg, Deutschland
CD61	AHIgG ₁	2C9.G2	PE	BD Pharmingen, Heidelberg, Deutschland
E-Cadherin	RIgG _{2a}	114420	unmarkiert	R&D Systems, Minneapolis, USA
Fc RI	AHIgG ₁	MAR-1	FITC	eBioscience, San Diego, USA
Fc RI	AHIgG ₁	MAR-1	PE	eBioscience, San Diego, USA
Fc RI	AHIgG ₁	MAR-1	unmarkiert	eBioscience, San Diego, USA
ICAM-1	RIgG _{2b}	166623	unmarkiert	R&D Systems, Minneapolis, USA
ICAM-2	RIgG _{2a}	3C4	unmarkiert	BD Pharmingen, Heidelberg, Deutschland
Isotypkontrolle	AHIgG ₁	eBio299Arm	FITC	eBioscience, San Diego, USA
Isotypkontrolle	RIgG ₁	R3-34	PE	BD Pharmingen, Heidelberg, Deutschland
Isotypkontrolle	RIgG _{2a}	R35-95	PE	BD Pharmingen, Heidelberg, Deutschland

Antigen	Isotyp	Klon	Konjugat	Hersteller
Isotypkontrolle	RIgG _{2b}	A95-1	PE	BD Pharmingen, Heidelberg, Deutschland
Isotypkontrolle	AHIgG ₁	eBio299Arm	PE	eBioscience, San Diego, USA
Isotypkontrolle	RIgG _{2a}	R35-95	unmarkiert	BD Pharmingen, Heidelberg, Deutschland
Isotypkontrolle	RIgG _{2b}	A95-1	unmarkiert	BD Pharmingen, Heidelberg, Deutschland
Isotypkontrolle	RIgG ₁	R3-34	unmarkiert	BD Pharmingen, Heidelberg, Deutschland
Isotypkontrolle	RIgG _{2a}	RTK2758	unmarkiert	BioLegend, San Diego, USA
JAM-1	RIgG _{2a}	BV12	unmarkiert	Hycult bt, Uden, Niederlande
JAM-2	RIgG _{2a}	150005	unmarkiert	R&D Systems, Minneapolis, USA
JAM-3	GIgG	polyklonal	unmarkiert	R&D Systems, Minneapolis, USA
Kit (CD117)	RIgG _{2b}	2B8	PE	eBioscience, San Diego, USA
PECAM-1	RIgG _{2a}	390	unmarkiert	BD Pharmingen, Heidelberg, Deutschland
T1/ST2	GIgG	polyklonal	Biotin	R&D Systems, Minneapolis, USA
THY1.2	RIgG _{2a}	53-2.1	unmarkiert	BD Pharmingen, Heidelberg, Deutschland
VCAM-1	RIgG ₁	M/K-2	unmarkiert	Acris, Herford, Deutschland
VCAM-1	RIgG _{2a}	429	unmarkiert	BioLegend, San Diego, USA

2.4 Verbrauchsmaterialien

Material	Typ	Hersteller
96er Maxisorp [®] Platte		NUNC, Wiesbaden, Deutschland
Biopsie-Kassetten	verschiedene Größen	Thermo Fisher Scientific, Walldorf, Deutschland
Deckgläser	24 x 46 mm	Menzel GmbH, Braunschweig, Deutschland
Handschuhe	Latex, Nitril	verschiedene Hersteller
Kanülen	25 Gauge	Braun, Melsungen, Deutschland

Material	Typ	Hersteller
Nitrocellulose-Membranen		Biostep, Jahnsdorf, Deutschland
<i>LightCycler® Capillaries</i>	20 µl	Roche, Mannheim, Deutschland
Thermodruckpapier		Mitsubishi, Düsseldorf, Deutschland
Objektträger	Superfrost	Menzel GmbH, Braunschweig, Deutschland
Papierfilter	90 mm	Schleicher & Schuell, Dassel, Deutschland
Pipetten	5 ml in 1/10, 10 ml in 1/10, 25 ml in 2/10	BD Falcon™, Heidelberg, Deutschland; Sarstedt AG & Co., Nümbrecht-Rommelsdorf, Deutschland
Pipetten-Spitzen	10 µl, 20 µl, 100 µl, 200 µl, 300 µl, 1000 µl	Sarstedt AG & Co., nerbe plus GmbH, STARLAB GmbH
Qiashredder		Qiagen, Hilden, Deutschland
Reaktionsgefäße	500 µl - 2000 µl	Sarstedt, Applied Biosystems, Eppendorf
Reaktionsgefäße	8-Tube Strips 0,2 ml	Kisker GbR, Steinfurt, Deutschland
Spritzen	10 ml, 50 ml	Braun, Melsungen, Deutschland
Zellkultur-Membraneinsätze	Porengröße 0,4 µm	BD Falcon™, Heidelberg, Deutschland
Zellkulturflaschen, steril	25 cm ² , 75 cm ² , 175 cm ² für Gewebezellen	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht-Rommelsdorf, Deutschland; BD Falcon™, Heidelberg, Deutschland
Zellkulturplatten, steril	6er, 24er, 96er für Gewebezellen	BD Falcon™, Heidelberg, Deutschland
Zentrifugenröhrchen	steril und unsteril, 5 ml, 15 ml und 50 ml	BD Falcon™, Heidelberg, Deutschland, Sarstedt AG & Co., Nümbrecht-Rommelsdorf, Deutschland; NUNC, Wiesbaden, Deutschland

2.5 Puffer und Lösungen

Bezeichnung	Zusammensetzung
Agarosegel-Lösung mit EtBr (2 %)	2 % Agarose 1 x TAE 0,5 µg/ml EtBr
FACS-Puffer	PBS ohne Ca ²⁺ und Mg ²⁺ 2 Gew./Vol. % BSA
Ladepuffer	10 mM EDTA 0,25 % Bromphenolblau Glycerol
TBST-Puffer	TBS-Puffer 0,05 % TWEEN-20
Waschpuffer (W-Puffer, pH 7,6) 1 x	PBS 0,05 % TWEEN-20

2.6 Kits

Bezeichnung	Hersteller
<i>1st Strand cDNA Synthesis Kit for RT-PCR (AMV)</i>	Roche, Mannheim, Deutschland
<i>CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay</i>	Promega, Mannheim, Deutschland
<i>EasySep® Mouse PE Positive Selection Kit</i>	Stem Cell Technologies
<i>ProteoJET™ Membrane Protein Extraction Kit</i>	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland
<i>RNeasy Mini Kit</i>	Qiagen, Hilden, Deutschland
<i>DNase I Kit</i>	Qiagen, Hilden, Deutschland
<i>RNeasy Mini Kit Plus</i>	Qiagen, Hilden, Deutschland
Histamin Elisa HIS EIA-4005	DRG Diagnostics, Marburg, Deutschland
rmIL-3 Elisa	Peprtech, Hamburg, Deutschland
rmSCF Elisa	Peprtech, Hamburg, Deutschland
Taq DNA Polymerase Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
<i>LightCycler® FastStart DNA Master SYBR Green I Kit</i>	Roche, Mannheim, Deutschland

Bezeichnung	Hersteller
<i>Western Lightning® Plus ECL</i>	Perkin-Elmer, Waltham (MA), USA

2.7 Medien

Bezeichnung	Hersteller
IMDM	PAA, Pasching, Österreich
DMEM	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Hybridoma SFM	Gibco, Life Technologies, Carlsbad, USA
Penicillin/Streptomycin	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Nicht-essentielle Aminosäuren	PAA, Pasching, Österreich
FBS	Biochrom AG, Berlin, Deutschland

Bezeichnung	Zusammensetzung
Cokulturmedium	IMDM mit 10 % X63-konditioniertes Medium 5 % FBS 1 % Penicillin/Streptomycin 1 % nicht-essentielle Aminosäuren 0,002 % α -Monothioglycerol
Fibroblasten-Kulturmedium	DMEM mit 10 % FBS 1 % Penicillin/Streptomycin 1 % nicht-essentielle Aminosäuren
Magermedium	IMDM mit 10 % X63-konditioniertes Medium 5 % FBS 1 % Penicillin/Streptomycin 0,002 % α -Monothioglycerol
Waschmedium	IMDM mit 10 % Penicillin/Streptomycin

Bezeichnung	Zusammensetzung
Vollmedium	IMDM mit 20 % X63-konditioniertes Medium 10 % FBS 1 % Penicillin/Streptomycin 0,002 % α -Monothioglycerol
X-63 Kulturmedium	Hybridoma SFM mit 2 % FBS 1 % Penicillin/Streptomycin 1 % nicht-essentielle Aminosäuren

2.8 Software

Software	Hersteller
Axio Vision Revaluation 4.6	Carl Zeiss, Jena, Deutschland
FCSExpress Version 3	De Novo Software, Los Angeles, USA
Light Cycler Software Version 3	Roche, Mannheim, Deutschland
NCBI databases	National Center for Biotechnology Information, Bethesda, USA
Primer 3	SourceForge, Mountain View, USA
Revaluation G3.2	DYNEX, Berlin, Deutschland
GeneSnap	Syngen, Cambridge, Großbritannien
CellQuest™ Pro	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland

3 Methoden

3.1 Versuchstiere

Als Versuchstiere wurden Mäuse des Inzuchtstammes C57BL/6 verwendet. Alle Versuchstiere wurden unter spezifischen Pathogen-freien Bedingungen in der tierexperimentellen Einrichtung des *Center for Cardiovascular Research* der Charité-Universitätsmedizin Berlin in einem 12-stündigen Hell-Dunkel-Rhythmus gehalten. Die Versuchstiere wurden nach geltenden Versuchstierbestimmungen in einem Typ III Käfig, bei einer angereicherten Käfigumgebung, bestehend aus grobem Einstreu, Nestbaumaterial, Nagehölzchen sowie Unterschlupfmöglichkeiten und freiem Zugang zu Wasser und pelletiertem Trockenfutter untergebracht. Die verwendeten C57BL/6-Kit^{+/-} sowie C57BL/6-Kit^{W-sh/W-sh}-Mäuse wurden von der Firma *Charles River Laboratories, Research Models and Services, Germany GmbH* bezogen oder stammten aus der eigenen Zucht der Arbeitsgruppe.

3.2 Zellbiologische Arbeiten

3.2.1 Knochenmark-generierte kultivierte murine Mastzellen (BMCMC)

Zur Präparation der Femora und Tibiae wurden 7-9 Wochen alte männliche C57BL/6-Kit^{+/-} bzw. -Kit^{W-sh/W-sh}-Mäuse nach einer Inhalationsnarkose mit Isofluran und zervikaler Dislokation desinfiziert. Danach wurden Haut und Muskulatur an den hinteren Gliedmaßen abpräpariert und die Hüftgelenke disloziert. Schließlich wurden Füße, Patella, Fibula, restliche Muskulatur und Sehnen vollständig entfernt, Femora und Tibiae desinfiziert und in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen mit sterilem Waschmedium gegeben und auf Eis gelagert. Unter sterilen Bedingungen wurde, nach dem Abschneiden der Kondylen, das Knochenmark aus Femora und Tibiae mit Waschmedium mittels Spritze und einer 25 Gauge Kanüle aus den Knochen gespült und durch mehrfaches Auf- und Abpipettieren mit einer 10 ml Stabpipette aufgebrochen. Anschließend wurden die Zellen durch Zentrifugation bei 300 g für 8 min bei 4°C pelletiert, in 20 ml/Maus Vollmedium resuspendiert und in eine 25 cm² Gewebezellkulturflasche überführt. Bis zur Verwendung wurden die Zellen bei 37°C und 5 % CO₂ in humider Atmosphäre kultiviert. Dabei erfolgte zweimal wöchentlich ein vollständiger Mediumwechsel. Darüber hinaus wurden die Kulturflaschen gewechselt, mit dem Ziel, die adhärent wachsenden Stromazellen sukzessive zu entfernen. Um

die Proliferationsrate der BMCMC vor den Experimenten zu reduzieren, wurde das Vollmedium ab Woche 3 der Kultivierung durch Magermedium ersetzt. Nach insgesamt 3-4 Wochen Kultur wurden die Zellen hinsichtlich ihrer Vitalität und Reinheit untersucht und, vorausgesetzt beide betragen $\geq 95\%$, für Experimente verwendet. Die Vitalitätsrate wurde durch Zellzählung nach Färbung mit Trypanblau-Lösung (vgl. Kapitel 3.2.6) bestimmt. Die Reinheit der BMCMC wurde durch Färbung der Zellen mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern gegen Fc ϵ RI α und Kit sowie anschließender durchflusszytometrischer Messung (vgl. Kapitel 3.3.1) ermittelt.

3.2.2 Verwendete Zelllinien

3.2.2.1 Swiss Albino 3T3 Fibroblasten

Die Swiss Albino 3T3 Zellen, eine immortalisierte embryonale Fibroblasten (Fb)-Zelllinie, wurde von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) bezogen und entsprechend den Empfehlungen der DSMZ in supplementiertem DMEM (Fb-Medium) kultiviert und zweimal pro Woche passagiert. Dazu wurde das Medium entfernt, der Zellrasen einmal mit kaltem PBS ohne Ca²⁺ und Mg²⁺ gespült und anschließend für 10 min mit Trypsin (0,5 Gew./Vol. %)/ EDTA (0,22 Gew./Vol. %) bei 37 °C und 5 % CO₂ in humider Atmosphäre inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe des doppelten Volumens von kaltem PBS gestoppt, die Zellen in Zentrifugenröhrchen überführt und für 8 min bei 300 g und 4 °C pelletiert. Im Anschluss wurden die Zellen in Fb-Medium resuspendiert und, in einer Ratio von 1:6 - 1:8 geteilt, in neuen Gewebezellkulturflaschen weiter kultiviert.

3.2.2.2 Hybridom-Zelllinie X63

Die rmIL-3-sezernierende Hybridom-Zelllinie, ursprünglich generiert von A. Rolink am ehemaligen Institut für Immunologie in Basel, wurde freundlicher Weise von Dr. Rolf Jessberger, Professor am Institut für Physiologische Chemie an der Medizinischen Fakultät der Technischen Universität in Dresden, zur Verfügung gestellt [170]. Die X63-Zellen wurden in Suspensionszellkulturflaschen mit 175 cm² Wachstumsfläche in 50-100 ml supplementiertem Hybridomzell-Kulturmedium bei 37 °C und 5 % CO₂ in humider Atmosphäre kultiviert. Zwei- bis dreimal wöchentlich wurden die Zellsuspensionen geteilt und mit frischem Kulturmedium versorgt. Zur Ernte des konditionierten Überstandes wurden die Zellsuspension in 50 ml Zentrifugenröhrchen bei 250 g und 4 °C für 10 min zentrifugiert, die Überstände zusammengefügt, sterilfiltriert und bis zur weiteren Verwendung bei –20 °C gelagert. Die erzielte rmIL-3-Konzentration wurde schließlich mittels ELISA (Kapitel 3.3.3) bestimmt.

3.2.3 Cokultur aus BMCMC und Fibroblasten

Der Versuchsaufbau der Cokultur aus BMCMC und Fb setzt sich aus verschiedenen Ansätzen zusammen. Zur Kontrolle wurden BMCMC und Fb jeweils allein kultiviert. Um die Auswirkungen einer Interaktion der Zellen zu untersuchen, wurden die Zellen einmal gemeinsam (Cokultur) und einmal, durch einen für Zellen unpassierbaren Transmembraneinsatz mit einer Porengröße von 0,4 μm , getrennt (Insert-Cokultur) in einem Ansatz kultiviert. Dazu wurden entsprechend der jeweiligen Ansätze am Tag -1 der Cokultur je 7×10^4 Fb pro Vertiefung/Well einer Gewebezellkulturplatte mit insgesamt sechs Vertiefungen/Wells in jeweils 3 ml Kulturmedium eingesät. Am darauf folgenden Tag 0 wurden, nach dem Verwerfen des Überstandes, die Fibroblasten-Monolagen jeweils mit 3 ml PBS gespült. Schließlich wurden entsprechend der verschiedenen Ansätze pro Vertiefung jeweils $1,4 \times 10^5$ BMCMC in 3 ml Cokulturmedium eingesät bzw. lediglich das Cokulturmedium dazu gegeben. Um die ausreichende Nährstoffversorgung der Zellen zu gewährleisten, wurde jeweils an Tag 3 und 7 der Cokultur das Medium gewechselt. Dazu wurden die Kulturüberstände zunächst in 50 ml Röhrchen überführt und bei 300 g für 8 min bei 4°C abzentrifugiert. Nach dem Verwerfen der Überstände wurden die Zellen in frischem Cokulturmedium gleichen Volumens resuspendiert und in die entsprechenden Ansätze zurückgegeben. Die Ernte der Zellen und Überstände zur späteren Analyse erfolgte jeweils an Tag 3, 7 und 11 der Cokultur.

3.2.4 Ernte der Cokultur-Ansätze

An Tag 3, 7 und 11 wurden Zellen und Zellkulturüberstände der Cokultur geerntet. Dazu wurden alle Überstände mit den ggf. darin enthaltenen Suspensionszellen in 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt und bei 300 g und 4°C für 8 min zentrifugiert. Die Überstände wurden aliquotiert und anschließend bei -80°C gelagert. Die Suspensionszellen wurden in kaltem PBS resuspendiert und bis zur weiteren Verwendung auf Eis gestellt. Die adhärenenten Zellen wurden je Vertiefung mit 1 ml 0,005 Gew./Vol. % Trypsin in PBS für 30 min bei 37°C und 5 % CO₂ in humider Atmosphäre inkubiert. Nach 30 min wurde die Trypsin-Behandlung durch die Zugabe des zweifachen Volumens an kaltem PBS abgestoppt, die Zellen durch Zentrifugation pelletiert, anschließend in kaltem PBS resuspendiert und auf Eis gelagert. Es wurde jeweils eine Probe zur Zellzählung und Vitalitätsbestimmung (vgl. Kapitel 3.2.6) entnommen. Eine weitere Probe wurde für die durchflusszytometrische Analyse (vgl. Kapitel 3.3.1) zur Bestimmung des Zellverhältnisses verwendet. Dazu wurden die Zellen mit den Antikörpern anti-Kit-FITC (MZ-Marker) und anti-Thy1.2-PE (Fb-Marker) gefärbt. Zusätzlich wurde eine Probe der Zellen mit anti-Fc ϵ RI-PE

gefärbt, um die Expression des hochaffinen IgE-Rezeptors auf den MZ zu überprüfen. Die Cokulturzellen wurden dann vor der späteren Analyse zunächst mittels magnetischer Zellseparation (vgl. Kapitel 3.3.2) getrennt, während die Zellen der anderen Ansätze ohne weitere Aufreinigung als Zellpellets bei -80°C eingelagert wurden.

3.2.5 Spezial-Cokultur

Um zu untersuchen, ob es durch die Cokultur von Fb und BMCMC zur Freisetzung relevanter löslicher Mediatoren kommt, wurde eine besondere Form der Cokultur etabliert. Dazu wurde, neben der BMCMC Kontrolle und der bereits beschriebenen Insert-Cokultur, eine Spezial-Insert-Cokultur angesetzt, wobei eine Hälfte (7×10^4) der eingesetzten BMCMC direkt auf den Fb und die andere Hälfte der BMCMC durch einen Transmembraneinsatz abgetrennt im selben Ansatz kultiviert wurden.

3.2.6 Zellzählung und Vitalitätsbestimmung mit Trypanblau - Lösung

Zur Bestimmung von Gesamtzellzahl und dem Anteil vitaler Zellen wurden jeweils 20 μl der zu untersuchenden Zellsuspension mit 20 μl einer 0,4-prozentigen (Gew./Vol.) Trypanblau-Lösung versetzt und in eine Neubauer-improved Zählkammer von Marienfeld (Tiefe 0,1 mm, Fläche eines Großquadrates 1 mm^2) gegeben. Vitale Zellen erscheinen nach einer Färbung mit Trypanblau-Lösung ungefärbt, tote Zellen sind hingegen stark dunkelblau gefärbt, da der Farbstoff durch die nicht intakte Zellmembran dringt. Es wurden pro Zellzählung mindestens 2x4 Großquadrate ausgezählt. Unter der Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors und der Daten der verwendeten Zählkammer wurden die Zellzahlen wie folgt errechnet:

$$\frac{\text{Anzahl der Zellen}}{\text{ausgezählte Fläche (4 mm}^2\text{) x Kammertiefe (0,1 mm) x Verdünnung(1/2)}} \times 10^3 = \text{Zellen pro ml.}$$

Formel 1: Berechnung der Zellzahl pro ml mittels Neubauer-improved Zählkammer

Die Vitalitätsrate der gezählten Zellen ließ sich durch die folgende Berechnung ermitteln:

$$\frac{\text{Anzahl der ungefärbten Zellen} - \text{Anzahl der dunkelblau gefärbten Zellen}}{\text{Anzahl der ungefärbten Zellen}} \times 100\% = \text{Vitalitätsrate in \%}.$$

Formel 2: Berechnung der Vitalitätsrate

3.3 Immunologische Arbeiten

3.3.1 Durchflusszytometrie

Bei der Durchflusszytometrie (engl. *Fluorescence Activated Cell Scanning*, FACS) handelt es sich um ein optisches Messverfahren zur Charakterisierung von Zellen. Diese werden dazu im Durchflusszytometer in einem Flüssigkeitsstrom in einer Kapillare einzeln an einem 635 nm Diodenlaser und einem 488 nm Argon-Laser vorbeigeführt. Das von den Zellen gestreute Licht wird detektiert. Dabei gibt das Vorwärtstreulicht (engl. *forward scatter*, FSC) Aufschluss über die Größe der Zellen und das Seitwärtstreulicht (engl. *side scatter*, SSC) über die Komplexität der Zellen, beeinflusst durch deren Granularität, Größe und Struktur des Zellkerns und die Menge der Vesikel im Zytoplasma. Mit dem Durchflusszytometer können neben dem Streulicht auch verschiedene emittierte Fluoreszenzen detektiert werden. Dadurch ist es beispielsweise möglich, durch Bindung fluoreszenzmarkierter Antikörper an Antigene der Zelle deren Expression zu untersuchen.

3.3.1.1 Spezifische Blockierung von CD16 (Fc γ RIII) und CD32 (Fc γ RII)

MZ exprimieren die IgG-Rezeptoren CD16 und CD32 auf der Zelloberfläche [23]. Um eine unspezifische Bindung der verwendeten fluoreszenzmarkierten Antikörper der Isotypen IgG₁, IgG_{2a} und IgG_{2b} an diese Rezeptoren auszuschließen, wurden die Zellen vor jeder Färbung mit einem spezifischen Antikörper gegen CD16 und CD32, dem sogenannten FcR-Block, vorinkubiert. Dazu wurden Zellen einmal mit kaltem PBS gewaschen, anschließend in einer Zelldichte von 1×10^6 /ml in FACS-Puffer aufgenommen und mit 0,8 µg/ml FcR-Block (aCD16/aCD32) für 15 min auf Eis inkubiert. Nach erneutem Waschen können die Zellen mittels spezifischer fluoreszenzmarkierter Antikörper gefärbt werden.

3.3.1.2 Färbung von Oberflächenmolekülen mit Fluorochrom-konjugierten Antikörpern

Nach der Inkubation mit dem FcR-Block wurden die Zellen in einer Dichte von 1×10^6 /ml in FACS-Puffer resuspendiert. In Ansätzen von 100 µl wurden die Zellen mit den entsprechenden spezifischen fluoreszenzmarkierten Antikörpern für 30 min in Dunkelheit auf Eis gefärbt. Zur Kontrolle wurden die entsprechenden Isotypkontrollen und ungefärbte Zellen mitgeführt. Im Anschluss daran wurden die Zellen pro Ansatz zweimal mit 400 µl FACS-Puffer gewaschen, dann in je 50 µl FACS-Puffer aufgenommen und zeitnah mit einem FACSCalibur und der Software *CellQuest*TM Pro der Firma Becton Dickinson analysiert. Die spätere Auswertung der Daten erfolgte mittels der Software *FCS Express Version 3* von De Novo Software.

3.3.1.3 Färbung von Oberflächenmolekülen mit Primär- und Sekundärantikörpern

Nach der Inkubation mit dem FcR-Block wurden die Zellen in einer Dichte von 1×10^6 /ml in FACS-Puffer resuspendiert. In Ansätzen von 100 µl wurden die Zellen mit den entsprechenden spezifischen unmarkierten Antikörpern für 30 min in Dunkelheit auf Eis gefärbt. Im Anschluss daran wurden die Zellen pro Ansatz zweimal mit 400 µl FACS-Puffer gewaschen und dann erneut in je 100 µl FACS-Puffer aufgenommen. Entsprechend der Isotypen der primären Antikörper wurde nun mit einem spezifischen fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörper gefärbt. Zur Kontrolle wurden ungefärbte Zellen und Zellen, welche lediglich mit Sekundärantikörper inkubiert wurden, mitgeführt. Anschließend wurden die Zellen pro Ansatz zweimal mit 400 µl FACS-Puffer gewaschen, dann in je 50 µl FACS-Puffer aufgenommen und zeitnah mit einem *FACSCalibur* und der Software *CellQuest™ Pro* der Firma Becton Dickinson analysiert. Die spätere Auswertung der Daten erfolgte mittels der Software *FCS Express Version 3* von De Novo Software.

3.3.1.4 Färbung von Oberflächenmolekülen mit Biotin-konjugierten Primärantikörpern und Fluorochrom-konjugiertem Streptavidin

Die Prozedur entspricht der oben beschriebenen Färbung von Oberflächenmolekülen mit Primär- und Sekundärantikörpern (vgl. Kapitel 3.3.1.3). Anstatt eines unkonjugierten Antikörpers wurde jedoch ein mit Biotin markierter spezifischer Antikörper verwendet und anstelle eines spezifischen fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörpers wurde Phycoerythrin-konjugiertes Streptavidin verwendet. Zur Kontrolle wurden ungefärbte Zellen und Zellen, welche nur mit Phycoerythrin-konjugiertem Streptavidin inkubiert wurden, mitgeführt.

3.3.2 Magnetische Zellseparation der Cokulturzellen

Um die MZ aus der Cokultur gezielt analysieren zu können, mussten sie zunächst von den Fb separiert werden. Bei der magnetischen Zellseparation nutzt man die Expression charakteristischer Oberflächenantigene zur Isolierung einzelner Zellpopulationen. Dazu werden magnetische Partikel verwendet, die an spezifische Antikörper gegen Oberflächenantigene gekoppelt werden. Durch ein magnetisches Feld können die mit diesen Partikeln markierten Zellen von den unmarkierten getrennt werden. Dabei kommen zwei verschiedene Strategien in Frage. Einerseits die positive Selektion, bei der die Zielzellen markiert werden, andererseits die negative Selektion, bei der die zu depletierenden Zellen markiert werden. Zur Separation der Cokulturzellen wurden verschiedene *EasySep® Mouse PE Positive Selection Kits* der Firma Stem Cell Technologies verwendet.

3.3.2.1 Negative Selektion der MZ mit *EasySep*[®] Mouse CD90.2 PE-Selection Kit

Bei der negativen Aufreinigung der MZ aus der Cokultur wurden die Fb mit einem spezifischen PE-markierten Antikörper gegen CD90.2, auch Thy1.2 genannt, und mit magnetischen Partikeln markiert. Dazu wurden die Cokulturzellen zunächst mit dem Separationsmedium gewaschen und dann in einer Zelldichte von 5×10^7 Zellen/ml in dem Separationsmedium aufgenommen. Anschließend wurde die Zellsuspension in ein 5 ml Zentrifugenröhrchen überführt und entsprechend der Vorgaben des Herstellers mit den magnetischen Nanopartikeln markiert. Nach dem Markieren wurde die Zellsuspension mit dem Separationsmedium auf ein Volumen von 2,5 ml aufgefüllt und in den Magneten gestellt. Durch das Magnetfeld wurden alle markierten Zellen, in diesem Fall die Fb, an der Wand des Röhrchens gehalten, während alle unmarkierten Zellen, hier die MZ, abgegossen werden konnten. Diese Prozedur wurde sowohl für die positive Fraktion als auch für die negative Fraktion jeweils dreimal wiederholt, um eine möglichst hohe Reinheit zu erreichen. Zur Überprüfung der Reinheit wurde im Anschluss eine durchflusszytometrische Analyse (vgl. Kapitel 3.3.1) nach zusätzlicher Färbung mit anti-Kit-FITC durchgeführt. Die Zellen wurden für spätere Untersuchungen einmal mit kaltem PBS gewaschen und als Zellpellets bei -80°C gelagert.

3.3.2.2 Positive Selektion der MZ mit *EasySep*[®] Mouse PE-Selection Kit

Bei der positiven Aufreinigung der MZ aus der Cokultur wurden die MZ mit einem spezifischen PE-markierten Antikörper gegen die alpha-Kette des hochaffinen IgE Rezeptors ($\text{Fc}_\epsilon\text{RI}_\alpha$) und den magnetischen Partikeln markiert. Diese Form der Aufreinigung wurde zur Gewinnung der Proben für die spätere Expressionsanalyse mittels *Affymetrix GeneChip*[®] Mouse Gene 1.0 ST Array und RTq-PCR verwendet, da sie eine höhere Reinheit erzielt und die gebundenen Nanopartikel nicht störend wirken. Dazu wurden die Cokulturzellen zunächst mit dem Separationsmedium gewaschen und dann in einer Zelldichte von 5×10^6 Zellen/ml in dem Separationsmedium aufgenommen, in ein 5 ml Zentrifugenröhrchen überführt und 15 min mit $1,6 \mu\text{g}$ FcR-Block ($\alpha\text{CD16/CD32}$) pro ml auf Eis inkubiert. Überschüssige Antikörper wurden durch einmaliges Waschen mit dem Separationsmedium entfernt. Danach erfolgte die Markierung der MZ mit dem PE-markierten Antikörper gegen $\text{Fc}_\epsilon\text{RI}_\alpha$ in einer Konzentration von $1 \mu\text{g/ml}$ für 30 min im Dunkeln auf Eis. Die Zellen wurden erneut gewaschen, in einer Zelldichte von 5×10^7 Zellen/ml in dem Separationsmedium aufgenommen und nach Vorschrift des Herstellers mit den magnetischen Nanopartikeln markiert. Anschließend wurde die Zellsuspension mit dem Separationsmedium auf ein Volumen von 2,5 ml aufgefüllt und in den Magneten gestellt. Durch das Magnetfeld wurden die markierten Zellen, hier die MZ, an der Wand des Röhrchens gehalten, während die

unmarkierten Zellen, in diesem Fall die Fb, abgegossen werden konnten. Diese Prozedur wurde für die positive Fraktion jeweils dreimal wiederholt, um eine möglichst hohe Reinheit zu erreichen. Zur Überprüfung der Reinheit wurde im Anschluss eine durchflusszytometrische Analyse (vgl. Kapitel 3.3.1) durchgeführt. Die Zellen wurden für spätere Untersuchungen einmal mit kaltem PBS gewaschen und als Zellpellets bei -80°C gelagert.

3.3.3 Enzym-gekoppelter Immunadsorptionstest (ELISA)

Der Enzym-gekoppelte Immunadsorptionstest (engl. *Enzyme-linked Immunosorbent Assay*, ELISA) ist ein immunologisches Verfahren zum Nachweis von Proteinen und niedermolekularen Verbindungen. Es basiert auf einer enzymatischen Reaktion mit Farbumschlag. Alle in dieser Arbeit verwendeten ELISA sind kommerziell erhältlich und wurden gemäß den Empfehlungen der Hersteller durchgeführt.

3.3.3.1 Probengewinnung für ELISA

Mittels ELISA wurden Zellkulturüberstände oder Zelllysate analysiert. Zellkulturüberstände wurden dazu durch Zentrifugation bei 300 g, bei 4°C für 8 min von Zellen befreit, aliquotiert und bei -80°C bis zur Verwendung gelagert. Zur Gewinnung der Zelllysate wurden die zu untersuchenden Zellen jeweils zweimal mit PBS ohne Ca^{2+} und Mg^{2+} gewaschen und schließlich als Zellpellets verschiedener Zellzahlen bei -80°C gelagert. Zur Lyse der Zellen wurden die Pellets bei Bedarf in PBS ohne Ca^{2+} und Mg^{2+} aufgenommen und durch Auftauen auf Eis, vortexen und erneutes Einfrieren auf Trockeneis, in insgesamt 5 Zyklen aufgebrochen. Anschließend wurden die Lysate für 20 min bei 4°C und 3000 g zentrifugiert, um die Zelltrümmer zu pelletieren. Die Überstände wurden dann in neue Reaktionsgefäße überführt und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert. Zur Analyse der Proben mittels ELISA wurden alle Proben höchstens zweimal aufgetaut und anschließend verworfen.

3.3.4 Untersuchung des Adhäsionsverhaltens von BMCMC an Fb

3.3.4.1 Analyse der Expression von Adhäsionsmolekülen auf den Fb

Der Fb-Zellrasen wurde nach dem Verwerfen des Zellkultur-Überstandes einmal mit kaltem PBS ohne Ca^{2+} und Mg^{2+} gewaschen und durch 10 min Inkubation mit Trypsin (0,5 Gew./Vol. %)/EDTA (0,22 Gew./Vol. %) bei 37°C und 5 % CO_2 in humider Atmosphäre abgelöst. Dann wurde die Reaktion durch Zugabe des doppelten Volumens an kaltem PBS gestoppt, die Zellen in Zentrifugenröhrchen überführt und für 8 min bei 300 g und 4°C pelletiert. Im Anschluss wurden die

Zellen einmal mit PBS gewaschen, gezählt (vgl. Kapitel 3.2.6) und in einer Zelldichte von $1 \times 10^6/\text{ml}$ in FACS-Puffer aufgenommen und mittels Primär- und Sekundärantikörpern (vgl. Tabelle 2), wie in Kapitel 3.3.1.3 beschrieben, markiert und durchflusszytometrisch analysiert.

Tabelle 2: Verwendete Primär- und Sekundärantikörper mit Konzentrationsangabe zur Detektion von Adhäsionsmolekülen auf Fb mittels FACS

Primärantikörper	Isotyp	Konzentration ($\mu\text{g/ml}$)	Sekundärantikörper
Anti - E-Cadherin	Ratte IgG _{2a}	3,0	PE-konjugiertes (ab') ₂ Fragment Ziege anti-Ratte IgG (5 $\mu\text{g/ml}$)
Anti - ICAM-1	Ratte IgG _{2b}	2,5	
Anti - ICAM-2	Ratte IgG _{2a}	3,0	
Anti - PECAM-1	Ratte IgG _{2a}	2,5	
Anti - THY1.2	Ratte IgG _{2a}	2,5	
Anti - VCAM-1	Ratte IgG ₁	2,5	
Anti - JAM-1	Ratte IgG _{2a}	3,0	
Anti - JAM-2	Ratte IgG _{2a}	2,5	
Anti - JAM-3	Ziege IgG	3,0	FITC-konjugiertes F(ab') ₂ Fragment Affe anti-Ziege IgG (7,5 $\mu\text{g/ml}$)

3.3.4.2 Analyse der Expression von Adhäsionsmolekülen auf den BMCMC

Die BMCMC wurden, wie in den Kapiteln 3.3.1.1 und 3.3.1.2 beschrieben, mit spezifischen Antikörpern gegen verschiedene Adhäsionsmoleküle (vgl. Tabelle 3) markiert und durchflusszytometrisch analysiert.

Tabelle 3: Verwendete Antikörper mit Konzentrationsangabe zur Detektion von Adhäsionsmolekülen auf BMCMC mittels FACS

Antikörper	Isotyp	Fluorochrom	Konzentration $\mu\text{g/ml}$
Anti-Kit	Ratte IgG _{2b}	PE	1,0
Anti-Fc RI	Armenischer Hamster IgG ₁	PE	1,0
Anti-Fc RI	Armenischer Hamster IgG ₁	FITC	2,5
Anti-T1/ST2	Ratte IgG	Biotin	1,0
Anti-CD11b	Ratte IgG _{2b}	PE	1,0
Anti-CD29	Armenischer Hamster IgG ₁	Biotin	2,5
Anti-CD31	Ratte IgG _{2b}	PE	1,0
Anti-CD49d	Ratte IgG _{2b}	PE	1,0
Anti-CD51	Ratte IgG ₁	PE	1,0
Anti-CD54	Ratte IgG ₁	PE	1,0
Anti-CD61	Armenischer Hamster IgG ₁	PE	1,0
Anti-Beta7	Ratte IgG _{2a}	PE	1,0
Isotypkontrolle	Ratte IgG ₁	PE	1,0
Isotypkontrolle	Ratte IgG _{2a}	PE	1,0
Isotypkontrolle	Ratte IgG _{2b}	PE	1,0
Isotypkontrolle	Armenischer Hamster IgG ₁	FITC	2,5
Isotypkontrolle	Armenischer Hamster IgG ₁	PE	1,0

3.3.4.3 Adhäsionsversuche mit blockierten Adhäsionsmolekülen

Vor jedem Adhäsionsversuch wurden je 1×10^5 Fb pro Kammer eines Kammerobjektträgers mit insgesamt 8 Kammern, in jeweils 400 μl Kulturmedium eingesät und bis zum Erreichen konfluenter Zellrasen bei 37°C und 5 % CO_2 in humider Atmosphäre inkubiert. Waren die Fb konfluent gewachsen, wurden die Versuche durchgeführt. BMCMC wurden, zur späteren Visualisierung, mittels Streptavidin-gekoppeltem Fluoreszenzfarbstoff *Cyanin Dye 3* (Cy3) von Sigma, mit D-Biotinyl- ϵ -Aminocapronsäure-N-Hydroxysuccinimidester (Biotin) von Roche biotinyliert (vgl. Kapitel 3.3.4.3.1). Anschließend wurden, entsprechend der Versuche, entweder Adhäsionsmoleküle auf den Fb (vgl. Kapitel 3.3.4.1) oder den BMCMC (vgl. Kapitel 3.3.4.2) durch funktionsblockierende Antikörper blockiert, bevor die Zellen gemeinsam inkubiert wurden, um Adhäsion zu ermöglichen (vgl. Kapitel 3.3.4.3.4). Nach Entfernung aller nicht adhärenen Zellen wurden die Präparate mittels eiskaltem Methanol fixiert und bis zur Färbung und Auswertung (vgl. Kapitel 3.3.4.3.5) bei -20°C aufbewahrt.

3.3.4.3.1 Biotinylierung der BMCMC

Um die gebundenen BMCMC später visualisieren zu können, wurden sie zunächst mittels Biotin markiert. Dazu wurden die BMCMC aus der Kultur entnommen, bei 300 g und 4°C für 8 min pelletiert, zweimal mit kaltem PBS ohne Ca^{2+} und Mg^{2+} gewaschen und mittels Trypanblau-Färbung und Zählkammer gezählt. Dann wurden die Zellen in einer Dichte von $1-4 \times 10^6$ Zellen/ml in kaltem PBS aufgenommen und nach Zugabe von 10 $\mu\text{l}/\text{ml}$ der Biotin-Lösung (25 mg/ml Dimethylformamid) 20 min auf Eis inkubiert. Die Reaktion wurde durch die Zugabe des 5-fachen Volumens an kaltem PBS gestoppt, die Zellen abzentrifugiert und dreimal mit kaltem PBS gewaschen und in serumfreiem IMDM resuspendiert. Bis zur weiteren Verwendung, entweder direkt zur Inkubation mit Fb oder zur vorherigen Blockierung von Adhäsionsmolekülen, wurden die BMCMC auf Eis gestellt.

3.3.4.3.2 Blockierung der Adhäsionsmoleküle auf Fb

Zur Blockierung verschiedener Adhäsionsmoleküle auf den Fb wurden diese je Kammer zweimal mit 500 μl PBS gespült. Anschließend wurden je 200 μl serum-freies IMDM mit den verschiedenen blockierenden Antikörpern (vgl. Tabelle 4) in der entsprechenden Konzentration dazugegeben und für 30 min bei 37°C und 5 % CO_2 in humider Atmosphäre inkubiert. Danach wurden ungebundene Antikörper durch zweimaliges Waschen mit je 400 μl PBS entfernt und die Zellen bis zur weiteren Verwendung mit je 200 μl serum-freiem IMDM pro Kammer bei 37°C und 5 % CO_2 in humider Atmosphäre inkubiert.

Tabelle 4: Verwendete Antikörper mit Konzentrationsangabe zur Blockierung von Adhäsionsmolekülen auf Fb

Antikörper	Isotyp	Fluorochrom	Konzentration µg/ml
Anti - VCAM-1	RIgG _{2a}	unmarkiert	2,5
Anti - ICAM-2	RIgG _{2a}	unmarkiert	2,5
Anti - E-Cadherin	RIgG _{2a}	unmarkiert	2,5
Anti - JAM-3	GIgG	unmarkiert	2,5
Anti - Thy1.2	RIgG _{2a}	unmarkiert	2,5
Isotypkontrolle	RIgG _{1a}	unmarkiert	2,5
Isotypkontrolle	RIgG _{2a}	unmarkiert	2,5
Isotypkontrolle	RIgG _{2b}	unmarkiert	2,5
Isotypkontrolle	RIgG _{2a}	unmarkiert	2,5

3.3.4.3.3 Blockierung der Adhäsionsmoleküle auf BMCMC

Zur Blockierung verschiedener Adhäsionsmoleküle auf den BMCMC wurden diese nach der Biotinylierung (vgl. Kapitel 3.3.4.3.1) in einer Zelldichte von $1 \times 10^6/\text{ml}$ in serum-freiem IMDM aufgenommen, in verschiedene Ansätze zu je 500 µl in 5 ml sterile Zentrifugenröhrchen pipettiert und mit den verschiedenen blockierenden Antikörpern (vgl. Tabelle 5) in den entsprechenden Konzentrationen für 30 min bei 37°C und 5 % CO₂ in humider Atmosphäre inkubiert. Danach wurden ungebundene Antikörper durch zweimaliges Waschen je Ansatz mit 500 µl serum-freiem IMDM entfernt, die Zellen jeweils in 500 µl serum-freiem IMDM resuspendiert und bis zur weiteren Verwendung und auf Eis gestellt.

Tabelle 5: Verwendete Antikörper mit Konzentrationsangabe zur Blockierung von Adhäsionsmolekülen auf BMCMC

Antikörper	Isotyp	Markierung	Konzentration µg/ml
CD29	AHIgG ₁	unmarkiert	1,3
CD49d	RIgG _{2b}	unmarkiert	1,3
beta7	RIgG _{2a}	unmarkiert	1,3
Isotypkontrolle	AHIgG ₁	unmarkiert	1,3
Isotypkontrolle	RIgG _{2a}	unmarkiert	1,3
Isotypkontrolle	RIgG _{2b}	unmarkiert	1,3

3.3.4.3.4 Adhäsion und Fixierung

Pro Kammer wurden 1×10^5 BMCMC in 200 µl serumfreiem IMDM für 30-60 min gemeinsam mit den Fb bei 37°C und 5 % CO₂ in humider Atmosphäre inkubiert. Alle nicht adhärenen Zellen wurden durch mehrfaches Waschen mit 400 µl PBS mit Ca²⁺ und Mg²⁺ pro Kammer entfernt und die Zellenrasen mittels eiskaltem Methanol für 10 min bei -20°C fixiert. Abschließend wurde das Methanol abgenommen. Die Kammerobjektträger wurden für 30 min bei Raumtemperatur luftgetrocknet und bis zur Färbung und Auswertung (vgl. Kapitel 3.3.4.3.5) bei -20°C aufbewahrt.

3.3.4.3.5 Färbung mit Streptavidin-Cy3 und Auswertung

Nach der Blockierung unspezifischer Bindungsstellen mit PBS mit 1 % BSA für 30 min bei Raumtemperatur, wurden die fixierten Zellen für 60 min mit Streptavidin-CY3 (2 µg/ml in PBS mit 1 % BSA) im Dunkeln gefärbt. Anschließend wurden die Zellen je zweimal mit 400 µl PBS gewaschen. Nach dem Entfernen der Kammern von den Objektträgern wurden die Präparate mit Glycerol eingedeckelt. Die Auswertung erfolgte an einem computergestützten Axioplan2-Mikroskop von Zeiss, gesteuert durch die Software *Axiovision Version 4.6* von Zeiss. Es wurden je Kammer 10 mikroskopische Felder bei einer 400-fachen Vergrößerung ausgezählt.

3.3.5 Stimulation von BMCMC mit immobilisiertem VCAM-1

Zur Beschichtung wurden am Tag -1 der Kultur Gewebezellkulturplatten mit 96 Vertiefungen mit der rmVCAM-1-hIgG-FcChimäre oder der hIgG-FcChimäre als Isotypkontrolle, jeweils in einer Konzentration von 10 µg/ml 0,1 Gew./Vol. % BSA in PBS mit Ca^{2+} und Mg^{2+} in einem Volumen von 100 µl pro Vertiefung, unter sterilen Bedingungen bestückt. Anschließend wurde die so vorbereitete Zellkulturplatte steril verpackt und über Nacht im Kühlschrank bei 4°C inkubiert. Vor der Einsaat der BMCMC wurden die Überstände verworfen, die Vertiefungen je zweimal mit 300 µl Cokulturmedium gespült und anschließend mit je 50 µl Cokulturmedium bzw. 50 µl Cokulturmedium mit 10 ng/ml rmSCF befüllt und für 1 h bei 37°C und 5 % CO_2 in humider Atmosphäre äquilibriert. Die BMCMC wurden vor der Einsaat aus der Kultur entnommen, bei 300 g und 4°C für 8 min pelletiert, einmal mit PBS ohne Ca^{2+} und Mg^{2+} gewaschen und nach Zellzählung und Vitalitätsbestimmung (vgl. Kapitel 3.2.6) auf eine Zelldichte von $2,5 \times 10^5$ pro ml in Cokulturmedium mit bzw. ohne 10 ng/ml rmSCF eingestellt. Pro Vertiefung der Zellkulturplatte wurden je 100 µl der Zellsuspension zu den bereits 50 µl Cokulturmedium gegeben, wodurch schließlich eine Zellzahl von $2,5 \times 10^4$ BMCMC in 150 µl Cokulturmedium pro Vertiefung erreicht wurde. Zur Gewährleistung einer ausreichenden Nährstoffversorgung der Zellen wurden an den Tagen 3 und 7 der Kultur je Vertiefung 50 µl des entsprechenden Kulturmediums dazu gegeben. An den Tagen 3 und 7 wurden die Zellen bezüglich ihrer Proliferation untersucht. Am Tag 11 wurden die Zellen für die Untersuchungen der Differenzierung geerntet.

3.3.5.1 Bestimmung der relativen Proliferation mittels MTS

Aufgrund der geringen Zellzahl wurde die Proliferation der BMCMC nach 3 bzw. 7 Tagen Inkubation mit VCAM-1, der Isotypkontrolle bzw. VCAM-1 oder Isotypkontrolle plus je 10 ng/ml rmSCF colorimetrisch mit Hilfe des *CellTiter 96® Aqueous One Solution Cell*

Proliferation Assay von Promega bestimmt. Dazu wurden in jede zu untersuchende Vertiefung 20 μl MTS (3-(4,5-dimethylthiazol)-2-yl-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium)/PMS (phenazine methosulfate solution)-Reagenz pro 100 μl Medium hinzupipettiert und die Zellen bei 37°C für ein bis zwei h bei 37°C und 5 % CO_2 in humider Atmosphäre inkubiert. Die Absorption des entstandenen Formazan-Produkts, die direkt proportional zur Anzahl der lebenden Zellen ist, wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 490 nm bestimmt. Pro Ansatz wurde eine Dreifach-Bestimmung durchgeführt.

3.3.5.2 Ernte der Zellen zur Bestimmung der Differenzierung

Am Tag 11 wurden die Zellen geerntet. Dazu wurden alle Zellen durch mehrfaches Auf- und Abpipettieren resuspendiert, in 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt und bei 300 g und 4°C für 8 min zentrifugiert. Die Überstände wurden verworfen und die Zellen in kaltem PBS gewaschen. Dann wurden sie in kaltem PBS resuspendiert. Es wurde jeweils eine Probe zur Zellzählung und Vitalitätsbestimmung (vgl. Kapitel 3.2.6) entnommen. Eine Probe aller Ansätze wurde als Zellpellet bei –80°C zur späteren Bestimmung des Histamingehaltes per ELISA (vgl. Kapitel 3.3.3) eingelagert. Eine weitere Probe aller Ansätze wurde in der RNA-stabilisierenden Lösung *RNAprotect® Cell Reagent* von Qiagen lysiert und bis zur weiteren Verarbeitung bei –20 bis –80°C gelagert.

3.4 Molekularbiologische Arbeiten

Um die Expression verschiedener MZ-Reifungsmarker auf der Ebene der messengerRNA (mRNA) zu untersuchen, wurden die mRNAs verschiedener Ansätze isoliert und mittels Reverse Transkriptase-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR) analysiert. Um später auch eine quantitative Auswertung der Expression verschiedener Marker zu ermöglichen, wurde zusätzlich eine Expressionsanalyse mittels Real-Time PCR durchgeführt. Um zusätzlich einen sehr umfassenden Überblick über die durch die Interaktion mit Fb in den MZ regulierten Gene zu erhalten, wurden einige Proben mittels *Affymetrix Mouse Gene 1.0 ST Array* untersucht.

3.4.1 Isolation von Ribonukleinsäure

Zur Isolierung der Ribonukleinsäure (engl. *ribonucleic acid*, RNA) wurden die entsprechenden Proben zu Zellpellets aus mindestens 5×10^5 Zellen verarbeitet, die dann in der RNA-stabilisierenden Lösung *RNAprotect® Cell Reagent* von Qiagen lysiert und bis zur weiteren Verarbeitung bei –20 oder –80°C gelagert wurden. Die Lysate wurden zunächst mit Hilfe der sogenannten *Qias shredder*

(Qiagen) homogenisiert. Danach wurde die RNA, den Herstellerangaben des verwendeten *RNeasy Plus Mini Kit* folgend, aus den Zelllysaten isoliert. Diese manuelle RNA-Präparationsmethode basiert auf der Verwendung von Silicagel-Membran-Zentrifugensäulen. Dabei wurde im ersten Schritt genomische DNA entfernt und in weiteren Schritten die RNA gefällt, gewaschen und luftgetrocknet. Abschließend wurde die RNA jeweils in RNase-freiem Wasser eluiert und bis zur weiteren Verarbeitung bei -80°C gelagert.

3.4.2 Expressionsanalyse mittels Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ist ein Verfahren zur Amplifikation spezifischer DNA-Fragmente [171]. Die RT-PCR ist eine besondere Form der PCR und eine zur Expressionsanalyse eines Zielgens standardmäßig genutzte Methode. Dazu wird die zu untersuchende RNA mittels Reverser Transkriptase (RT) in stabilere *complementary* DNA (cDNA) umgeschrieben. Als Primer werden, anstatt eines sequenzspezifischen Primerpaares, beispielsweise Oligo-dT-Primer verwendet, deren Sequenz zum PolyA-Schwanz am 3'-Ende der mRNA komplementär ist. Die RT synthetisiert dann cDNA ausgehend von diesem Primer in Richtung 5'-Ende des mRNA-Stranges.

Die cDNA dient als Template für die sich anschließende PCR. Dazu werden sequenzspezifische Oligonukleotide als Primer benötigt. Wurde das Zielgen in den untersuchten Proben exprimiert, so kann dies nun durch die Amplifikation des entsprechenden spezifischen PCR-Produktes nachgewiesen werden.

3.4.2.1 Reaktionsansatz für die cDNA-Synthese für RT-PCR

Zum Umschreiben der RNA in cDNA wurde das *1st Strand cDNA Synthesis Kit for RT-PCR* (AMV) von Roche verwendet. Um eine spezifische Amplifikation von mRNA zu erreichen, wurden Oligo-dT-Primer verwendet. Die Reaktionsansätze hatten jeweils ein Gesamtvolumen von 20 μl , bestehend aus 8 μl der jeweiligen RNA, 2 μl PCR-Puffer (10-fach konzentriert), 4 μl MgCl_2 (25 mM), 2 μl Oligo-dT-Primer (800 $\mu\text{g}/\text{ml}$), 2 μl dNTP-Mix (10 mM), 1 μl RNase Inhibitor (50 U/ μl) und 0,8 μl AMV-RT (25 U/ μl). Der Ansatz wurde im Cyclex Modell Primus 96 der Firma Thermo inkubiert. Zunächst erfolgte für 10 min bei 25°C die Primeranlagerung. Direkt im Anschluss fand die cDNA-Synthese bei 42°C für 60 min statt, welche mit der Denaturierung der AMV-RT durch 5 min bei 99°C abgeschlossen wurde. Diese Inaktivierung des Enzyms ist notwendig, um Interaktionen in der folgenden PCR zu verhindern. Die cDNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

3.4.2.2 Primer-Design

Um PCR-Primer zu entwerfen, wurden zunächst die Sequenzen der zu untersuchenden mRNAs in der Nukleotid-Datenbank des *National Center for Biotechnology Information (NCBI, Build 37.1)* recherchiert (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide>). Mit Hilfe des Programms Primer3 Version 0.4.0. (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3>) wurden alle verwendeten Primersequenzen generiert. Dabei wurde darauf geachtet, dass der GC-Anteil 40 %-60 % beträgt und die Annealing-Temperaturen zwischen 55 und 62 °C liegen, wobei sie innerhalb eines Paares möglichst gleich sein sollten. Die Primer wurden so ausgewählt, dass Interaktionen zwischen ihnen ausgeschlossen sind und die amplifizierten Fragmente eine Länge von 120-300 bp haben. Um auszuschließen, dass die Primer an mehreren Stellen im Maus-Genom binden, wurden sie mit dem BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) im NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) getestet. Tabelle 6 zeigt eine Übersicht über die verwendeten Primersequenzen, die Annealingtemperaturen und die Länge der Fragmente. Die Primersequenzen für die HPRT wurden von der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Margitta Worm aus Berlin zur Verfügung gestellt. Alle weiteren Primersequenzen wurden selbst generiert.

Tabelle 6: Nukleotidsequenzen der verwendeten PCR-Primer mit den entsprechenden Annealing- Temperaturen und Fragmentlängen

Gen	Primersequenz (vorwärts)	Primersequenz (rückwärts)	Annealing- temperatur für PCR	Transkript- länge für
<i>cpa</i>	5'-CGTGGGACTCTTCTCCAAAC-3'	5'-ATGCTATTGGGCCGTAGATG-3'	58 °C	288 bp
<i>mcpt4</i>	5'-CAGCTACCTGTGGTGGGTTT-3'	5'-GTCAGAAGGACGAGGCAGAG-3'	58 °C	266 bp
<i>mcpt5</i>	5'-GGCAGAACAAACGTGAATGA-3'	5'-CTATCCCAGCACACAGCAGA-3'	58 °C	190 bp
<i>hdc</i>	5'-GGATTCTGGGTCAAGGACAA-3'	5'-AACCAAGGTGCCTCTTAGCA-3'	58 °C	280 bp
<i>hpri</i>	5'-CGTCGTGATTAGCGATGATG-3'	5'-AATCCAGCAGGTCAGCAAAG-3'	58 °C	221 bp

3.4.2.3 Reaktionsansatz für die RT-PCR

Für die PCR wurde der *Taq* DNA Polymerase Kit von Qiagen und dNTPs von Roth verwendet. Der Ansatz für eine PCR-Reaktion hatte ein Gesamtvolumen von 25 µl. Er enthielt 2 µl cDNA, 2,5 µl 10-fach konzentrierten PCR-Puffer mit 15 mM MgCl₂, je 200 µM dATP, dCTP, dGTP und dTTP, beide Primer in einer Konzentration von jeweils 400 nM und 0,5 U *Taq*-DNA-Polymerase. Das PCR-Programm startete mit einem Denaturierungsschritt von 5 min bei 95 °C, dem 32 Zyklen mit 30 s Denaturierung bei 95 °C, 30 s Primeranlagerung bei 58 °C und 30 s DNA-Synthese bei 72 °C folgten. Mit einem finalen 5-minütigen Elongationsschritt bei 72 °C wurde die Reaktion abgeschlossen.

3.4.2.4 Agarosegelelektrophorese zur Kontrolle der PCR

Die Agarosegelelektrophorese ist ein Standardverfahren zur Auftrennung von DNA-Fragmenten und ihrer Größenbestimmung anhand eines DNA-Standards. Für die Kontrolle der PCRs wurden je 5 µl der Ansätze auf ein 2-prozentiges Agarosegel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. Dazu wurden 2 g Agarose in 100 ml 1xTAE-Puffer in der Mikrowelle gelöst, aufgeköcht und beim Abkühlen mit 0,5 µg/ml Ethidiumbromid (EtBr) versetzt und in Kammern gegossen, die mit Kämmen versehen waren. Nach dem Erstarren des Gels wurden die Kämmen aus dem Gel entfernt und je 5 µl PCR-Produkt, mit 1 µl 6-fach konzentriertem Gel-Ladepuffer versetzt, in die Geltaschen gefüllt. Zur Abschätzung des Molekulargewichts und der Konzentration der Produkte wurde stets DNA-Standard-Marker mitgeführt. Die Elektrophorese erfolgte für 1 h in 1xTAE-Puffer bei 120 V. Anschließend konnten die entstandenen Produktbanden durch das in die DNA interkalierte EtBr unter UV-Bestrahlung sichtbar gemacht (Fluoreszenz) und fotografisch dokumentiert werden.

3.4.3 Quantitative Expressionsanalyse mittels Real-Time PCR

Die Real-Time PCR (RTq-PCR) ist ein Verfahren zur Nukleinsäurequantifizierung. Es erlaubt die Beobachtung der Amplifikation der Ziel-DNA in Echtzeit. Dies wird beispielsweise durch interkalierende Fluoreszenzfarbstoffe (z.B. EtBr oder SYBR GREEN I) ermöglicht, deren Fluoreszenzintensität nach dem Einbau in doppelsträngige DNA erheblich verstärkt ist. Somit ist der Anstieg der Fluoreszenzintensität, die nach jeder Elongationsphase gemessen wird, proportional zur Zunahme der Ziel-DNA. Zur späteren Quantifizierung wird der Cp-Wert (engl. *Crossing Point*) bestimmt. Dieser beschreibt den Zyklus der RTq-PCR, in dem die Fluoreszenzintensität und somit die Anzahl der Ziel-DNA-Moleküle beginnt exponentiell anzusteigen.

Durch den Vergleich des Cp-Wertes für das Ziel-Gen mit dem eines internen Referenz-Gens kann nun eine relative Quantifizierung der Expression erfolgen. Die Berechnung des Verhältnisses der Expression des zu untersuchenden Gens zu der des Referenz-Gens erfolgt unter der Berücksichtigung der Effizienz der jeweiligen Primer. Eine Effizienz von 100 % würde eine Verdopplung der DNA-Menge pro PCR-Zyklus bedeuten. Somit ist die DNA-Menge nach n Zyklen $(\text{Effizienz})^n$. Die relative Expressionsrate (R) eines Gens einer Probe (z.B. behandelte Zellen) im Vergleich zur Kontrolle (z.B. unbehandelte Zellen) ergibt sich somit aus der Effizienz (E) und den Cp-Werten des Ziel-Gens im Verhältnis zu denen des Referenz-Gens [172].

$$R = \frac{(E_{\text{Ziel-Gen}})^{\Delta CP_{\text{Ziel-Gen}}(Kontrolle-Probe)}}{(E_{\text{Referenz-Gen}})^{\Delta CP_{\text{Referenz-Gen}}(Kontrolle-Probe)}}$$

Formel 3: $\Delta\Delta C_p$ Methode zur relativen Quantifizierung (nach M.W.Pfaffl [172])

3.4.3.1 Reaktionsansatz für die RTq-PCR

Für die RTq-PCR wurden der *LightCycler® FastStart DNA Master SYBR Green I Kit*, das *LightCycler® 1.5 Instrument* und die *LightCycler® Capillaries* von Roche verwendet. Die Reaktionen wurden, den Angaben des Herstellers entsprechend, angesetzt. Jedoch wurde das Gesamtvolumen auf 5 µl pro Ansatz reduziert. Dabei sind je 2 µl cDNA, 0,5 µl Mix aus *LightCycler® FastStart Reaction Mix SYBR Green I* (10-fach konzentriert) und Fast-Start Enzym, 0,6-0,8 µl 25 mM MgCl₂ (vgl. Tabelle 7), je 0,25 µl Primer (verschiedene Endkonzentration, vgl. Tabelle 7) und 1,2-1,4 µl H₂O enthalten. Alle Reaktionen wurden in Duplikaten angesetzt. In jedem Lauf wurden Kontrollen ohne Template mitgeführt. Prozessiert wurden die Ansätze mit dem Roche *Applied Science LightCycler® 1.5*, gesteuert durch die Software *LightCycler® 3*. Die Auswertung erfolgte ebenfalls mit der Software *LightCycler® 3* (vgl. Tabelle 8).

Tabelle 7: Bedingungen für die RTq-PCR

Gen	MgCl ₂ - Konzentration / Volumen pro Ansatz	Primerkonzentration	Annealingtemperatur	Effizienz
<i>mcpt4</i>	5 mM / 0,8 µl	250 nM	60 °C	1,83
<i>hdc</i>	4 mM / 0,6 µl	250 nM	60 °C	1,99
<i>hprt</i>	4 mM / 0,6 µl	500 nM	60 °C	1,91

Tabelle 8: Protokolle für die RTq-PCR

Zielgen	Arbeitsschritt		Temperatur	Zeit	Temperaturänderungsrate	Anzahl der Zyklen
mcpt4 und hdc	Denaturierung		95 °C	10 min	20 °C/sec	1
	Amplifikation	Denaturierung	95 °C	10 sek	20 °C/sec	40
		Anlagerung	60 °C	10 sek	20 °C/sec	
		Elongation	72 °C	8 sek	20 °C/sec	
	Schmelzkurve	Denaturierung	95 °C	0 sek	20 °C/sec	1
		Renaturierung	65 °C	15 sek	20 °C/sec	
		Denaturierung	95 °C	0 sek	0,1 °C/sec	
	Kühlen		40 °C	30 sek	20 °C/sec	1
	Denaturierung		95 °C	10 min	20 °C/sec	1
	hprt	Amplifikation	Denaturierung	95 °C	10 sek	20 °C/sec
Anlagerung			62 °C	5 sek	20 °C/sec	
Elongation			72 °C	6 sek	20 °C/sec	
Schmelzkurve		Denaturierung	95 °C	0 sek	20 °C/sec	1
		Renaturierung	65 °C	15 sek	20 °C/sec	
		Denaturierung	95 °C	0 sek	0,1 °C/sec	
Kühlen		40 °C	30 sek	20 °C/sec	1	

3.4.4 Analyse des gesamten Transkriptoms mittels *Affymetrix Mouse Gene 1.0 ST Array*

Durch die Verwendung der *Whole Genome GeneChip*[®] Array Technologie, zu denen der *Mouse Gene 1.0 ST Array* zählt, ist es möglich, das Expressionsverhalten aller Gene im untersuchten Material zum selben Zeitpunkt zu analysieren.

3.4.4.1 Vorbereitung der Proben

Zur Analyse des Einflusses den der Kontakt zu Fb auf das gesamte Genexpressionsmuster der BMCMC hat, wurden die RNAs von BMCMC, MZ aus der Insert-Cokultur (InsertMZ), und der aufgereinigten MZ (vgl. Kapitel 3.3.2.2) aus der Cokultur an Tag 11 isoliert (vgl. Kapitel 3.4.1). Insgesamt wurden RNA-Proben aus drei verschiedenen Cokultur-Experimenten für die Analyse mittels *GeneChip*[®] isoliert und bis zur Verwendung bei -80°C gelagert.

3.4.4.2 Durchführung

Die Prozessierung der RNA-Proben, die Hybridisierung, die Verarbeitung der Rohdaten und die Vergleichsanalyse erfolgte in den Laboratorien des Kompetenzzentrum für Fluoreszente Bioanalytik (KFB), Regensburg.

3.4.5 Western Blot

Swiss Albino 3T3 Fb wurden in Gewebezellkulturschalen (10 cm Durchmesser) bis zum Erreichen von 80 cm^2 Konfluenz bei 37°C in humider Atmosphäre mit 5 % CO_2 kultiviert. Die cytoplasmatischen Proteine und Membranproteine wurden mittels *ProteoJET*[™] *Membrane Protein Extraction Kit* nach den Empfehlungen des Herstellers extrahiert. Dabei wurde der Zellrasen nach Entfernung des Mediums viermal mit eiskalter (4°C) Zellen-Wasch-Lösung gespült. Anschließend wurden die Zellen für 10 min auf Eis mit dem Zell-Permeabilisierungspuffer inkubiert. Danach wurde der Überstand (cytoplasmatische Fraktion) für 5 min mit 16000 g bei 4°C zentrifugiert, vorsichtig abgenommen und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert. Auf die permeabilisierten Zellen wurde eiskalter Membranprotein-Extraktionspuffer gegeben und für 30 min bei 4°C unter Schütteln mit 450 U/min inkubiert. Anschließend wurden die Membranproteine durch Zentrifugation mit 16000 g für 15 min bei 4°C von Zelltrümmern getrennt und ebenfalls bei -80°C gelagert.

Die Proteine wurden mittels 12-prozentiger SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis*) aufgetrennt und auf Nitrocellulose-Membranen von Biostep übertragen.

Anschließend wurden die Membranen je zweimal für 5 min mit TBST-Puffer (Tris-gepufferte Saline mit 0,05 % Tween) gewaschen und dann mit einer Lösung aus TBST-Puffer und 5 % Trockenmilch für zwei h geblockt. Dann wurden die entsprechenden Membranen mit anti-SCF-Antikörper von *R&D Systems* bzw. der Isotypkontrolle über Nacht inkubiert. Danach wurde je dreimal für je 5 min mit TBST Puffer gewaschen und dann mit dem Sekundäntikörper anti-Goat-HRP von *Santa Cruz* für 2 h inkubiert und danach wieder dreimal für jeweils 5 min mit TBST Puffer gewaschen. Schließlich wurde mittels ECL von *Western Lightning® Plus-ECL* und *Enhanced Chemiluminescence Substrate* von Perkin-Elmer entwickelt. Diese Arbeiten erfolgten im Rahmen einer Kooperation durch Dr. Sebastian Drube am Institut für Immunologie am Universitätsklinikum Jena.

3.5 Histologische Arbeiten

3.5.1 Gewebepräparation

Zur späteren histologischen Untersuchung von Embryonen eines exakt definierten Alters, erfolgte die terminierte Verpaarung von C57BL/6-*Kit*^{+/+} bzw. C57BL/6-*Kit*^{W-sh/W-sh}-Tieren. Dazu wurden jeweils zwei bis vier weibliche Tiere mit einem Männchen des gleichen Genotyps über Nacht zusammengesetzt. Am darauf folgenden Morgen wurden jene Weibchen separiert, die einen deutlich sichtbaren Vaginal-Pfropf als Zeichen einer erfolgten Paarung aufwiesen. Dieser Tag wurde als E d0 definiert. Die Embryonen wurden den Mäusen nach zervikaler Dislokation nativ entnommen und in 4-prozentiger Paraformaldehyd-Lösung (PFA) für 24-72 h fixiert. Embryonen der Zeitpunkte E d16 wurden vor der Fixierung sagittal halbiert, um ein für die Fixierung günstigeres Volumen/Oberfläche-Verhältnis zu gewährleisten.

3.5.2 Paraffin-Einbettung

Die in 4-prozentigem PFA fixierten Präparate wurden zur Entwässerung und Paraffinaufnahme im Karussell-Gewebeeinbettautomat *Shandon Citadel™ 1000* automatisch sukzessive in Wasser, 70-prozentigem Ethanol, 95-prozentigem Ethanol, Ethanol absolut, Xylol und flüssigem Paraffin inkubiert. Anschließend wurden die Präparate am *Shandon Histocentre 2* in Paraffin eingebettet.

3.5.3 Herstellung von Paraffinschnitten

Am Mikrotom *Shandon Finesse 325* wurden die Präparate sagittal nahe der Medianebene in einer Dicke von etwa 4-5 µm geschnitten und mittels Wasser (Shandon GFL Wasserbad) auf Objektträger

aufgezogen. Anschließend wurden die Paraffinschnitte im Trockenschrank bei 60°C über Nacht getrocknet.

3.5.4 Giemsa-Färbung an Paraffinschnitten

Zunächst wurden die Präparate zur Entparaffinierung sukzessive dreimal für 10 min in Xylol, zweimal für 5 min in Ethanol absolut, zweimal für 5 min in 95-prozentigen Ethanol und zweimal für 5 min in 70-prozentigen Ethanol getaucht (absteigende Alkoholreihe). Abschließend wurden sie dreimal für je 5 min mit Aqua dest. gespült. Die Färbung erfolgte für 15 min mit unverdünnter und filtrierter Giemsa's Azur Eosin-Methylenblau Lösung. Zur Differenzierung wurden die Präparate kurz in 0,1 %-iger Essigsäure inkubiert und direkt mit Aqua dest. gespült. Abschließend wurde zur Entwässerung dreimal für 10 s in Ethanol absolut, danach dreimal für 5 min in Xylol gespült und mit *Organo/Limonene-Mount*TM eingedeckelt. Bis zur Auswertung wurden die Präparate lichtgeschützt und trocken bei RT aufbewahrt.

3.5.5 Mikroskopische Auswertung

Die Auswertung der Präparate und die fotografische Dokumentation erfolgte an einem computergestützten Axioplan2 Mikroskop von Zeiss, gesteuert durch die Software *Axiovision Version 4.6* von Zeiss.

3.6 Statistische Auswertung

Die Datensätze wurden zunächst mittels dem *Kolmogorow-Smirnow-Test* auf Vorliegen einer Normalverteilung geprüft. Lag eine Normalverteilung vor, wurden je nach Experiment gepaarte bzw. ungepaarte Stichproben mit Hilfe der *t-Tests* ausgewertet. Lag keine Normalverteilung vor, wurden abhängige Stichproben mit dem *Friedman Test*, einer Erweiterung des *Wilcoxon-Test* (Vorzeichenrangtest) analysiert. Zur Analyse der Unterschiede zwischen verschiedenen Gruppen wurde die *Analysis of Variance* (ANOVA) und der *Bonferroni post-Test* angewendet. Zur statistischen Auswertung der Daten wurden die Programme *GraphPad Prism* und *StatView* verwendet. Als statistisch signifikant gelten * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$ und *** $P < 0,001$ bzw. + $P < 0,05$; ++ $P < 0,01$ und +++ $P < 0,001$.

4 Ergebnisse

4.1 Die Cokultur mit Fibroblasten induziert eine verstärkte Proliferation und die Differenzierung von Mastzellen

Zahlreiche Arbeiten belegen, dass die Cokultur von MZ mit Fb zu einer verstärkten Proliferation und zu einem veränderten MZ-Phänotyp führt, der dem der Bindegewebsmastzellen (engl. *Connective tissue mast cell*, CTMC) entspricht [153, 173–175]. Da kokultivierte MZ fest an Fb adhären [74], wurde untersucht, in wie weit dieser direkte Zell-Zell-Kontakt für die Fb-induzierte Proliferation und Differenzierung verantwortlich ist.

4.1.1 Die Fibroblasten-induzierte Proliferation der Mastzellen ist kontaktabhängig

Um den Einfluss der Fb auf die Proliferation der MZ zu überprüfen, wurden von insgesamt 6 Cokulturen die Zellzahlen der MZ an Tag 3, Tag 7 und Tag 11 der Cokultur bestimmt (vgl. Abbildung 4A). Die Anzahl der MZ stieg in allen Ansätzen während der untersuchten 11-tägigen Cokulturphase an, wobei die Vitalitätsrate mit im Durchschnitt 91 %-97 % relativ konstant blieb. Wie erwartet sind die Zellzahlen der mit Fb kokultivierten MZ (CokuMZ) mit $1,82 \times 10^6$ MZ/Kavität an Tag 3 und $10,4 \times 10^6$ MZ/Kavität an Tag 7, im Vergleich zur Kontrolle (BMCMC) mit $0,96 \times 10^6$ MZ/Kavität an Tag 3 und $2,51 \times 10^6$ MZ/Kavität an Tag 7 der Kultur, deutlich erhöht. Wenn der direkte Zellkontakt von BMCMC und Fb durch eine Membran unterbunden (InMZ) wurde, kam es mit $0,92 \times 10^6$ MZ/Kavität an Tag 3 und $2,30 \times 10^6$ MZ/Kavität an Tag 7 nicht zu einer derartigen Steigerung der MZ-Proliferation, im Vergleich zur Kontrolle. Am Tag 11 des Experiments sind die Zellzahlen in der Cokultur mit $11,43 \pm 2,64 \times 10^6$ MZ/Kavität und in der Kontrolle mit $9,92 \pm 4,58 \times 10^6$ MZ/Kavität vergleichbar und im Insert mit $5,62 \pm 1,95 \times 10^6$ MZ/Kavität sogar geringer. Damit blieb die Anzahl der MZ von Tag 7 bis Tag 11 in der Cokultur mit Zellkontakt relativ konstant, wohingegen die MZ-Zahlen in der Kontrolle und in der Cokultur ohne direkten Zellkontakt weiter deutlich anstiegen. Da die Zellzahlen der verschiedenen Cokultur-Ansätze starke Schwankungen aufwiesen, wurden die Daten schließlich normiert, wobei die Zellzahlen der BMCMC jeweils auf 100 % gesetzt wurden (vgl. Abbildung 4B). An Tag 3 der Cokultur unterschieden sich die Zellzahlen von CokuMZ mit $189,3 \pm 41,8$ % und InMZ mit $96,1 \pm 4,5$ % signifikant ($n=6$, $P<0,001$). Am größten ist der Unterschied der Zellzahlen an Tag 7, wobei die

Anzahl der CokuMZ im Vergleich zur Kontrolle mit $425,3 \pm 123,04$ % mehr als vierfach erhöht war. Die Anzahl der InMZ war dagegen mit $94,2 \pm 10,9$ % nicht derartig erhöht ($n=6$, CokuMZ vs. InMZ, $P<0,001$). An Tag 11 der Kokultur betrug die Zellzahl der InMZ $65,4 \pm 18,7$ % der Kontrolle, die Anzahl der CokuMZ hingegen war mit $141,9 \pm 62,5$ % signifikant höher ($n=6$, $P<0,05$). Diese Ergebnisse deuten auf eine Fb-induzierte kontaktabhängige Proliferation der MZ hin.

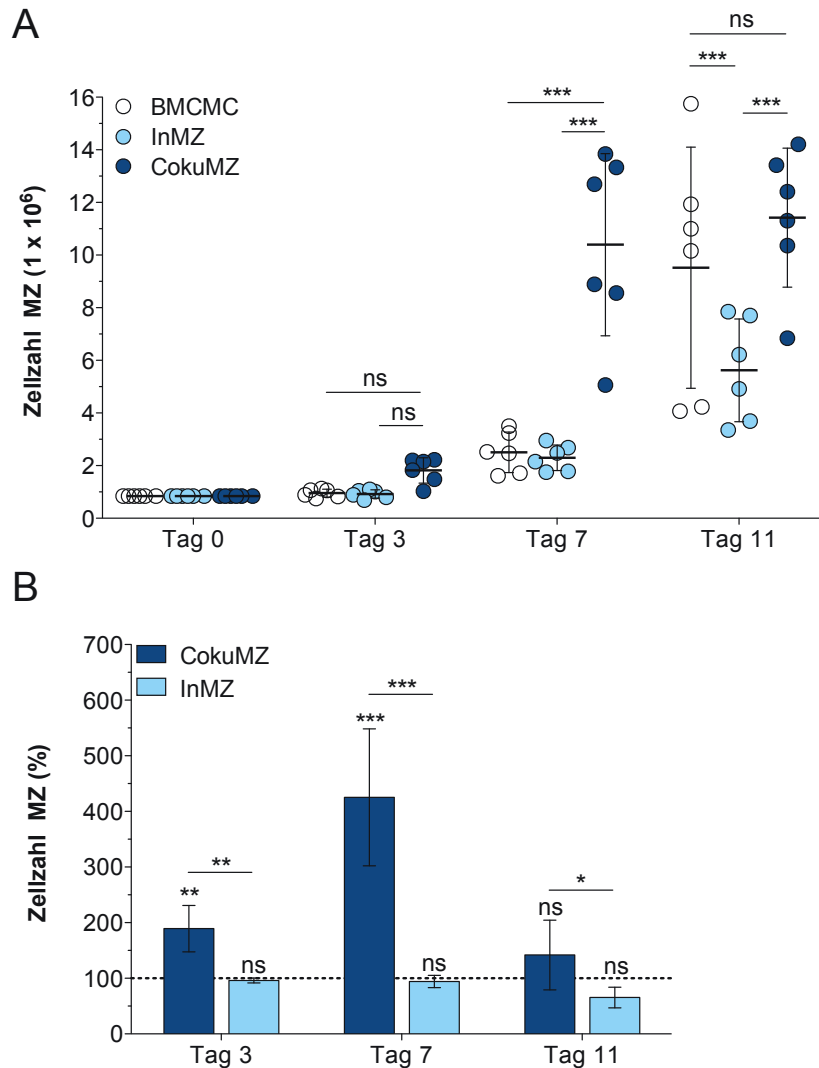


Abbildung 4: Fb-induzierte MZ-Proliferation ist kontaktabhängig

(A) Anzahl der vitalen MZ pro Kavität in den Kontrollen (BMC MC), den kokultivierten MZ mit Zellkontakt (CokuMZ) und ohne Zellkontakt zu den Fb (InMZ) an den Tagen 0, 3, 7 und 11 der Kokultur. Daten sind als Einzelergebnisse gezeigt, mit Mittelwert (MW, horizontale Linie) und Standardabweichung (SD) aus 6 unabhängigen Experimenten (*** $P<0,001$; ns nicht signifikant $P>0,05$; Two-Way ANOVA mit Bonferroni-Test). (B) Relative Anzahl der CokuMZ und InMZ im Vergleich zur Anzahl der BMC MC, welche als Kontrolle diente und als 100 % (gestrichelte Linie) festgelegt wurden. Die Zellzahlen der Kontrollen betragen $9,6 \times 10^5 \pm 1,53 \times 10^5$ an Tag 3, $2,5 \times 10^6 \pm 7,7 \times 10^5$ an Tag 7 und $9,5 \times 10^6 \pm 4,6 \times 10^5$ an Tag 11 der Kultur. Die Ergebnisse sind als MW \pm SD aus 6 unabhängigen Versuchen dargestellt (*** $P<0,001$; ** $P<0,01$; * $P<0,05$; ns nicht signifikant $P>0,05$; Two-Way ANOVA mit Bonferroni-Test).

4.1.2 Die Fibroblasten-induzierte Veränderung des Mastzell-Phänotyps ist kontaktabhängig

Frühere Arbeiten zeigten, dass die gemeinsame Kultivierung von MZ und Fb zu einer Veränderung des MZ-Phänotyps in Richtung CTMC führt [153, 173–175]. In diesem Zusammenhang wurde der Einfluss des direkten Zellkontaktes auf den Histamingehalt und das Protease-Expressionsmuster auf mRNA-Ebene untersucht. Ein hoher Histamingehalt und die starke Expression der Chymasen MCPT-4 und -5 sowie der Exopeptidase CPA sind bekannte Differenzierungsmarker der CTMC (Übersicht in [63]).

4.1.2.1 Der erhöhte Histamingehalt der kokultivierten Mastzellen ist kontaktabhängig

Um die MZ bezüglich ihres Histamingehaltes zu untersuchen, wurden die jeweiligen Zelllysate von Tag 3, 7 und 11 von insgesamt 6 Cokulturen mittels ELISA analysiert und die Menge an Histamin pro 1×10^6 MZ errechnet (vgl. Abbildung 5). Nach 3 Tagen Cokultur gab es bezüglich des Histamingehaltes pro 1×10^6 MZ keine Unterschiede zwischen den BMC MC mit $433,8 \pm 228,2$ ng und den InMZ mit $486,9 \pm 259,9$ ng ($P > 0,05$). Die CokuMZ enthielten mit $261,8 \pm 130,7$ ng nicht signifikant mehr Histamin als die BMC MC ($P > 0,05$) und InMC ($P > 0,05$). An Tag 7 der Cokultur war der Histamingehalt der CokuMZ mit $919,8 \pm 423,5$ ng/ 10^6 Zellen im Vergleich zu dem der BMC MC mit $148,0 \pm 75,9$ ng/ 10^6 Zellen hingegen 6-fach erhöht ($P < 0,001$). Dieser Unterschied war noch deutlicher nach 11 Tagen Cokultur. Für diesen Zeitpunkt betrug der Histamingehalt der CokuMZ $1721,5 \pm 960,1$ ng/ 10^6 Zellen und der der BMC MC $113,0 \pm 69,4$ ng/ 10^6 Zellen ($P < 0,001$), was einer 15-fachen Steigerung in den CokuMZ entspricht. Interessanterweise war diese Steigerung des Histamingehaltes nicht vorhanden, wenn der direkte Zellkontakt zwischen den MZ und den Fb unterbunden war, wie die Ergebnisse für die InMZ zeigen (Tag 7: $232,2 \pm 110,7$ ng/ 10^6 MZ, $P > 0,05$ und Tag 11: $269,2 \pm 181,2$ ng/ 10^6 MZ, $P > 0,05$). Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass der Fb-induzierte Anstieg des Histamingehaltes der MZ ebenfalls kontaktabhängig ist.

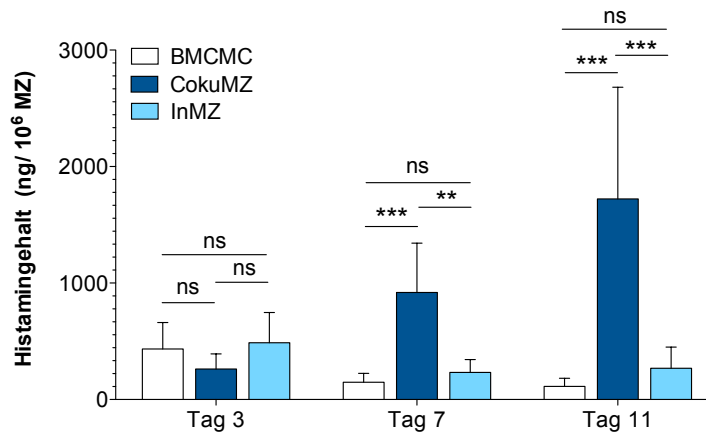


Abbildung 5: Fb-induzierter Anstieg des Histamingehaltes in kokultivierten MZ ist kontaktabhängig

Gezeigt ist der Histamingehalt pro 1×10^6 MZ der Kontrollen (BMCMC), der kokultivierten MZ mit Zellkontakt (CokuMZ) und ohne Zellkontakt zu den Fb (InMZ) an den Tagen 0, 3, 7 und 11 der Kokultur. Die Daten sind als MW \pm SD aus 6 unabhängigen Experimenten dargestellt (** $P < 0,001$; * $P < 0,01$; * $P < 0,05$; ns nicht signifikant $P > 0,05$; Two-Way ANOVA mit Bonferroni-Test).

4.1.2.2 Die Expressionslevel von *mcpt4* und *hdc* sind in kokultivierten Mastzellen kontaktabhängig erhöht

Neben dem erhöhten Histamingehalt ist unter anderem die Expression der MZ- Proteasen MCPT-4, MCPT-5 und CPA charakteristisch für CTMC (Übersicht in [63]). Um einen ersten Überblick zu gewinnen, wurden zunächst semi-quantitative RT-PCRs mit spezifischen Primern für *mcpt4*, *mcpt5* und *cpa* am Tag 11 der Kokultur durchgeführt (vgl. Abbildung 6A). Des Weiteren wurde die Expression der Histidindecarboxylase (HDC) untersucht. HDC decarboxyliert Histidin zu Histamin und ist damit das Schlüsselenzym der Histaminproduktion [176]. Als endogene Kontrolle der PCR wurde jeweils das Haushaltsgen *hprt*, welches die Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase codiert, amplifiziert. Die Produkte der RT-PCRs wurden mittels Agarosegelelektrophorese überprüft. Wie das Bandenmuster in Abbildung 6A zeigt, wurden die *mcpt5* und *mc-cpa* von allen untersuchten Zellen vergleichbar stark exprimiert. Hingegen wurden die *hdc* und *mcpt4* von den BMCMC und InMZ nur schwach, von den CokuMZ jedoch stark exprimiert, wie die unterschiedlichen Intensitäten der Produktbanden verdeutlichen.

Um die Unterschiede der Expressionsniveaus von *hdc* und *mcpt4* an Tag 11 der Kokultur quantifizieren zu können, wurden sie mittels quantitativer RTq-PCR analysiert. Wie in der Abbildung 6B gezeigt, konnten die Ergebnisse der RT-PCR verifiziert werden. Die Expression der *mcpt4* war in den CokuMZ im Vergleich zur Kontrolle (Relative Expression=1) 462,2-fach erhöht, die der InMZ nur 2,7-fach. Damit unterscheiden sich die Expressionsniveaus der *mcpt4* von CokuMZ und InMZ signifikant ($n=3$, $P < 0,01$). Die *hdc*-Expression war in den CokuMZ, mit

einer 28,0-fachen Erhöhung, stärker als die der InMZ, welche im Vergleich zur Kontrolle eine nur 1,26-fach erhöhte *hdc*-Expression aufwiesen ($n=3$, CokuMZ vs. InMZ $P<0,05$). Dies deutet auf eine kontaktabhängige Fb-induzierte Steigerung der Expression beider Enzyme hin.

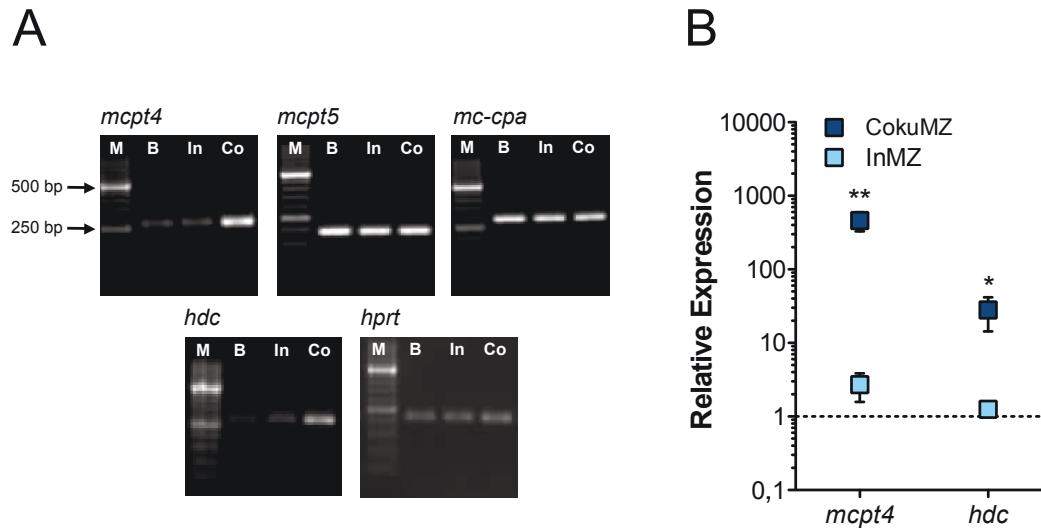


Abbildung 6: Die Fb-induzierte Hochregulation der Expression von *mcp4* und *hdc* ist kontaktabhängig

(A) Repräsentative Ergebnisse der RT-PCR für die Transkripte *mcp4*, *mcp5*, *cpa*, *hdc* und *hprt* (Haushaltsgen) von Proben der Kontrollen (BMC MC, B), den kokultivierten MZ ohne Zellkontakt (InMZ, In) und mit Zellkontakt zu den Fb (CokuMZ, Co) an Tag 11 der Kokultur. Gezeigt sind die Produktbanden der RT-PCR im Agarosegel aus einem von insgesamt 6 Experimenten; M=Größenmarker. (B) Relative Expression der Transkripte *mcp4* und *hdc* am Tag 11 der Kokultur in InMZ und CokuMZ im Vergleich zur Kontrolle (BMC MC), welche als 1 festgelegt wurde (gestrichelte Linie). Die Expressionsraten wurden anhand der Expression des Haushaltsgens *hprt* normiert. Die Daten sind als MW ± SD aus 3 unabhängigen Experimenten dargestellt (** $P<0,01$; * $P<0,05$; Student's T-Test)

4.2 Mastzellen adhären durch VCAM-1/ $\alpha_4\beta_7$ -Interaktion an Fibroblasten

Um zu untersuchen welche Oberflächenmoleküle an der Adhäsion beteiligt sind, wurden zunächst die Fb durchflusszytometrisch auf die Expression verschiedener Adhäsionsmoleküle untersucht. Im Anschluss daran wurde durch Blockierung der nachgewiesenen Adhäsionsmoleküle auf den Fb ermittelt, welche der Moleküle an der Adhäsion beteiligt sind. Danach wurde durchflusszytometrisch bestimmt, welche Liganden der beteiligten Adhäsionsmoleküle von den BMC MC exprimiert werden. Abschließend wurden, durch Blockierung dieser Adhäsionsmoleküle auf den BMC MC, die interagierenden Partnermoleküle identifiziert.

4.2.1 VCAM-1 auf Fibroblasten ist an der Adhäsion von Mastzellen beteiligt

Die durchflusszytometrische Analyse zeigte eine erhöhte mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) jener Fb, welche mit Antikörpern gegen JAM-3 ($13,6 \pm 2,9$; $P < 0,05$), Thy1.2 ($545,6 \pm 608,7$; $P > 0,05$) und VCAM-1 ($178,5 \pm 87,3$; $P < 0,05$) und den entsprechenden Fluoreszenz-markierten Sekundärantikörpern markiert wurden, im Vergleich zu den Kontrollen, welche nur mit PE-markiertem Sekundärantikörper ($2,5 \pm 1,0$) bzw. FITC-markiertem Sekundärantikörper ($2,4 \pm 0,8$) allein inkubiert wurden (vgl. Abbildung 7A und B). Keine signifikanten Unterschiede zur Kontrolle zeigten die MFI der Fb, welche gegen E-Cadherin ($10,6 \pm 5,4$), ICAM-1 ($2,7 \pm 1,0$), ICAM-2 ($6,5 \pm 4,9$), JAM-1 ($3,3 \pm 1,1$), JAM-2 ($2,6 \pm 0,9$) und PECAM-1 ($3,1 \pm 1,3$) gefärbt wurden. Im nächsten Schritt wurde in einem Blockierungsexperiment untersucht, ob die relevanten Kandidaten JAM-3, VCAM-1 und Thy1.2 an der Interaktion von MZ und Fb beteiligt sind. Obwohl die Färbung der Moleküle E-Cadherin und ICAM-2 statistisch nicht signifikant war, wurden sie dennoch in die Untersuchung einbezogen.

Die Adhäsion von BMCMC an Fb war durch die Blockierung von VCAM-1 auf den Fb mit $59,3 \pm 18,6$ % im Vergleich zur Kontrolle signifikant reduziert ($P < 0,001$). Als Kontrolle diente hierbei die durchschnittliche Anzahl adhärenter BMCMC an unblockierten Fb pro Gesichtsfeld, die als 100 % betrachtet wurde. Die Blockierung von ICAM-2 ($100,8$ % \pm $22,8$ %, $P > 0,05$), JAM-3 ($114,6$ % \pm $22,8$ %, $P > 0,05$), E-Cadherin ($101,1$ % \pm $32,6$ %, $P > 0,05$) und Thy-1 ($100,8$ % \pm $22,4$ %, $P > 0,05$) auf Fb sowie die Inkubation mit den Isotypkontrollen IgG₁ ($98,8$ % \pm $7,4$ %, $P > 0,05$), IgG_{2a} ($91,5$ % \pm $12,5$ %, $P > 0,05$) und IgG_{2b} ($108,2$ % \pm $15,6$ %, $P > 0,05$) hemmten die Adhäsion der BMCMC an die Fb hingegen nicht (vgl. Abbildung 7C).

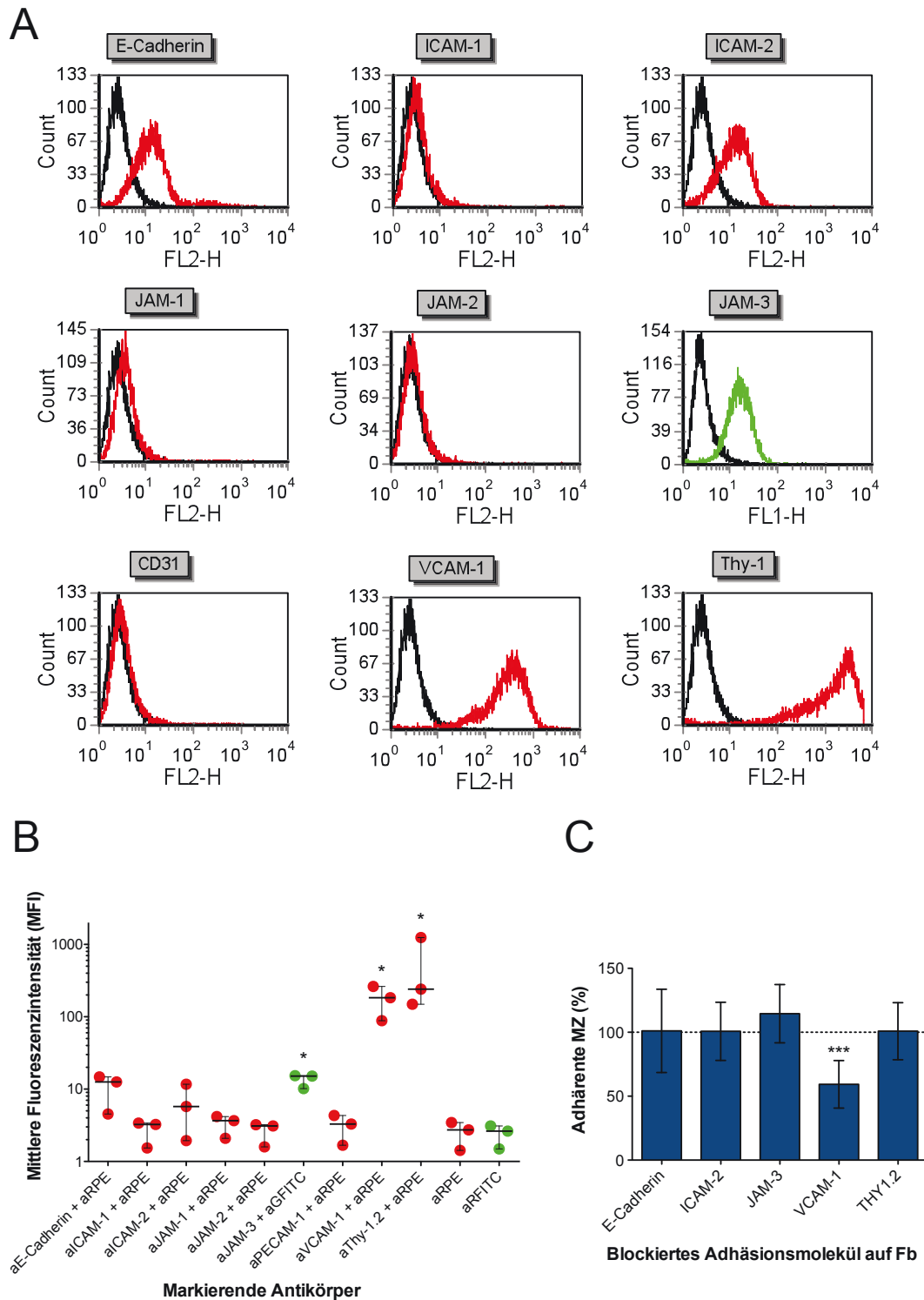


Abbildung 7: Von Fibroblasten exprimiertes VCAM-1 ist an der Adhäsion von MZ beteiligt

(A) Repräsentative Ergebnisse der durchflusszytometrischen Analyse der Fb (Histogrammdarstellung), nach Färbung verschiedener Oberflächenmoleküle, aus insgesamt drei unabhängigen Experimenten. Die Schwarzen Linien repräsentieren die Fluoreszenz der Kontrollzellen, welche nur mit dem entsprechenden Sekundärantikörper inkubiert wurden. Die roten Linien zeigen die Fluoreszenz der mit PE markierten Zellen, die grünen Linien die Fluoreszenz der FITC-markierten. (B) MFI der Fb, nach Färbung verschiedenen Adhäsionsmoleküle mit den entsprechenden Primär- und Sekundärantikörpern. Als Kontrollen dienten Fb, die mit den Sekundärantikörpern allein inkubiert wurden. Die roten Kreise zeigen die MFI der mit PE markierten Zellen, die grünen Kreise jene der FITC-markierten. Die Daten sind als Einzelwerte mit Median (Linie) und Spannweite (n=3, * $P < 0,05$; *Friedman Test* und *Dunn's Test*) gezeigt. (C) Relative Anzahl der adhärenz MZ an Fb, nach Blockade der verschiedenen Adhäsionsmoleküle auf den Fb, im Vergleich zur unblockierten Kontrolle, welche als 100 % festgelegt wurde (gestrichelte Linie). Die Daten sind als MW \pm SD aus 3 bis 9 unabhängigen Experimenten gezeigt (***) $P < 0,001$; *Student's T-Test*).

4.2.2 VCAM-1-Ligand $\alpha_4\beta_7$ -Integrin auf Mastzellen vermittelt die Adhäsion an Fibroblasten

Die durchflusszytometrische Analyse der BMCMC (vgl. Abbildung 8A und B) zeigte erhöhte MFI nach einer Färbung der BMCMC gegen α_4 -Integrin (CD49d, $35,9 \pm 13,9$; $P < 0,05$), β_1 -Integrin (CD29, $422,3 \pm 124,9$; $P < 0,05$) und β_7 -Integrin ($28,9 \pm 9,2$; $P < 0,01$), im Vergleich zu den Kontrollen (RIgG_{2b}-PE $3,6 \pm 0,8$ für CD49d; RIgG_{2a}-PE $3,6 \pm 0,8$ für β_7 und PE-markiertem Streptavidin $4,3 \pm 1,1$ für CD29). Diese Daten zeigen, dass beide VCAM-1-Liganden $\alpha_4\beta_1$ und $\alpha_4\beta_7$ von den BMCMC exprimiert werden.

Die Blockierung von α_4 und β_7 , jedoch nicht β_1 -Integrin, auf der Oberfläche von BMCMC hemmte deren Adhäsion an Fb (vgl. Abbildung 8B). Im Detail war die Anzahl adhärenter MZ nach der Blockierung mittels anti- α_4 mit $36,3 \pm 22,6$ % im Vergleich zur Isotypkontrolle mit $76,1 \pm 20,2$ % deutlich reduziert ($P < 0,01$), wobei die Anzahl adhärenter unbehandelter BMCMC an Fb als 100 % gesetzt wurde. Auch die Blockierung von β_7 -Integrinen führte mit $42,9 \pm 16,1$ % adhärenten BMCMC, im Vergleich zur Isotypkontrolle mit $59,1 \pm 20,5$ % adhärenten BMCMC, zu einer Reduktion der Anzahl adhärrender MZ ($P < 0,01$). Kein signifikanter Unterschied hingegen bestand zwischen den Zellen, die mit Antikörpern gegen β_1 blockiert wurden ($60,5 \pm 34,4$ %) und denen, die mit der korrespondierenden Isotypkontrolle ($95,4 \pm 38,8$ %) inkubiert wurden ($P > 0,05$). Insgesamt zeigen die Daten, dass die feste Adhäsion von BMCMC an Fb zumindest zu einem großen Teil durch die Interaktion von VCAM-1 auf Fb und $\alpha_4\beta_7$ -Integrin auf BMCMC vermittelt wird.

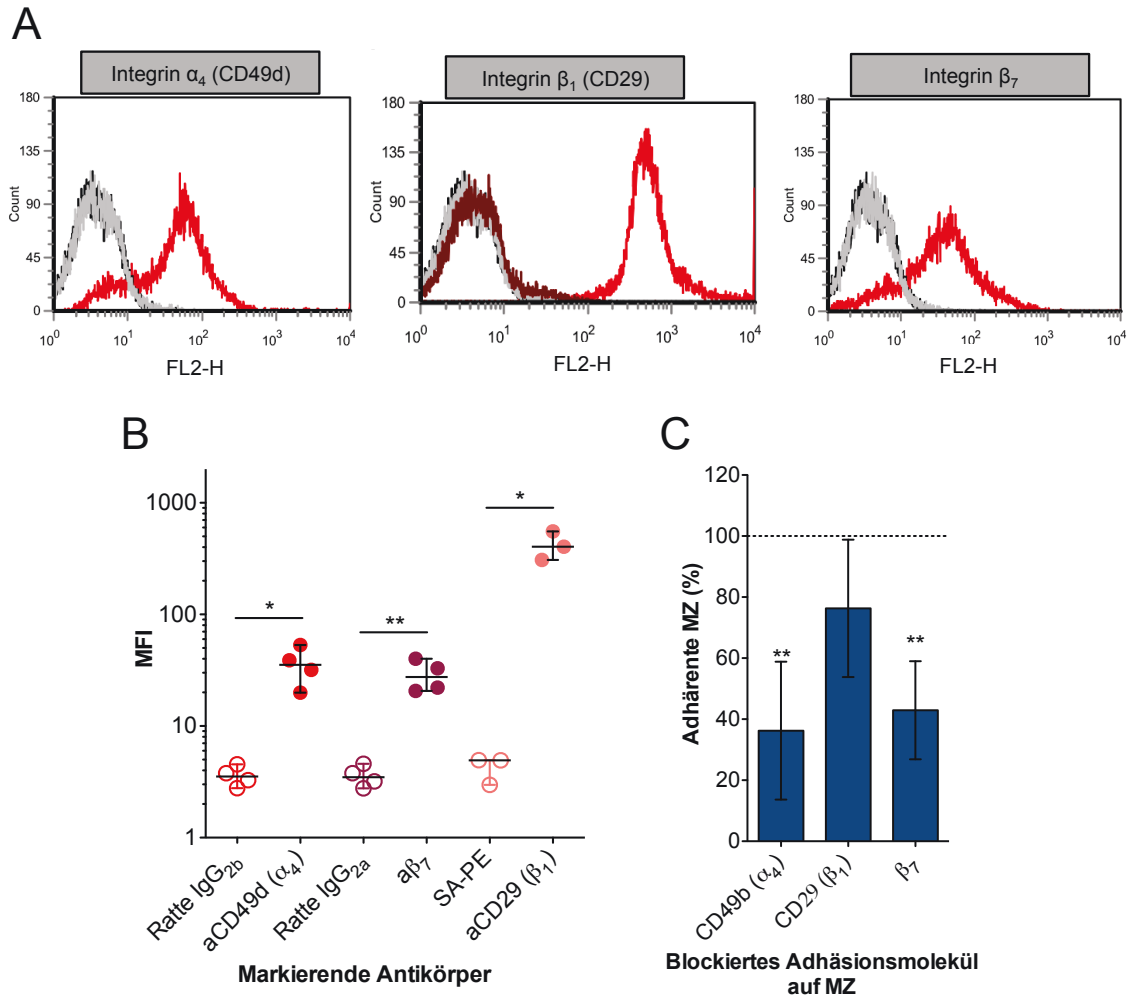


Abbildung 8: Integrin $\alpha_4\beta_7$ auf BMCMC ist an der Adhäsion an Fb beteiligt

(A) Repräsentative Ergebnisse der durchflusszytometrischen Analyse der BMCMC, nach Färbung verschiedener VCAM-1-Liganden, als Histogrammdarstellung. Die schwarzen Linien repräsentieren die Fluoreszenz der ungefärbten Kontrollzellen. Die grauen Linien zeigen die Fluoreszenz der BMCMC, welche nur mit dem entsprechenden Isotypkontrollen bzw. mit Streptavidin-PE allein inkubiert wurden. Die roten Linien stellen die Fluoreszenz der mit PE markierten Zellen dar. Die dunkelrote Linie zeigt die Fluoreszenz der BMCMC, die nur mit dem Primär-AK aCD29-Biotin behandelt wurden. Dargestellt sind die Daten je eines von insgesamt 3 (CD29) bis 4 (CD49b und β_7) unabhängigen Experimenten. (B) MFI der BMCMC, nach Färbung der verschiedenen VCAM-1-Liganden mit den entsprechenden Antikörpern. Die Daten sind als Einzelwerte mit Median (Linie) und Spannweite (n=3 für Sa-PE und aCD49b, alle anderen n=4; ** P<0,01; * P<0,05; Student's T-Test) gezeigt. (C) Relative Anzahl der adhärenen MZ an Fb, nach Blockade der verschiedenen Adhäsionsmoleküle auf den BMCMC, im Vergleich zur unblockierten Kontrolle, welche als 100 % festgelegt wurde (gestrichelte Linie). Die Daten sind als MW \pm SD aus 3 (CD29) bis 4 (CD49b und β_7) unabhängigen Experimenten (** P<0,01; Student's T-Test) gezeigt.

4.3 Mastzellen zeigen Proliferation aber nicht Differenzierung nach Adhäsion an immobilisiertes VCAM-1

Die Adhäsionsversuche ergaben, dass die Interaktion zwischen VCAM-1 und dem $\alpha_4\beta_7$ -Integrin die Adhäsion von BMC MC an die Fb vermittelt. Da für die verstärkte Proliferation und Differenzierung der MZ der direkte Zellkontakt zu Fb notwendig ist, wurde untersucht, ob die Interaktion von VCAM-1 und $\alpha_4\beta_7$ -Integrin selbst diese Prozesse auslösen kann. Dazu wurden BMC MC für insgesamt 11 Tage auf immobilisiertem VCAM-1 oder der entsprechenden Isotypkontrolle kultiviert. Um eine mögliche synergistische Wirkung von VCAM-1 mit dem von Fb exprimierten Stammzellfaktor (engl. *Stem cell factor*, SCF) zu untersuchen, wurden zusätzlich zwei Ansätze mit VCAM-1-Molekülen bzw. Isotypkontrolle plus je 10 ng/ml rmSCF in die Untersuchung einbezogen.

Die Kultivierung von BMC MC auf immobilisiertem VCAM-1 führte zu einer gesteigerten Proliferation der MZ, wie die erhöhte OD von $1,6 \pm 0,2$ im Vergleich zur Isotypkontrolle mit $1,2 \pm 0,3$ ($P < 0,01$) verdeutlicht (vgl. Abbildung 9A). Auch die Stimulation mit 10 ng/ml SCF führte erwartungsgemäß zu einer Steigerung der Proliferation im Vergleich zur Kontrolle, wie die OD von $1,7 \pm 0,4$ ($P < 0,05$) zeigt. Die Proliferation wird weiter gesteigert durch die simultane Stimulation der MZ mit 10 ng/ml SCF und immobilisiertem VCAM-1 ($2,1 \pm 0,5$). Dabei unterschied sich die gemessene OD signifikant von der OD für die Kultur mit Isotyp und SCF ($P < 0,05$), jedoch nicht signifikant von der OD für die Kultur auf immobilisiertem VCAM-1 allein ($P > 0,05$).

Interessanterweise gab es bezüglich des Histamingehaltes mit $369,1 \pm 126,0$ ng/ 10^6 MZ für die Isotypkontrolle, $302 \pm 129,9$ ng/ 10^6 MZ für VCAM-1, $437,9 \pm 116,4$ ng/ 10^6 MZ für die Isotypkontrolle plus SCF und $449,0 \pm 108,3$ ng/ 10^6 MZ für VCAM-1 plus SCF keine signifikanten Unterschiede an Tag 11 der Kultur (vgl. Abbildung 9B). Dies spiegeln auch die Ergebnisse der RTq-PCR für die HDC wieder. Es gab keine Unterschiede bezüglich der Expressionslevel für *hdc* (vgl. Abbildung 9C). Dies gilt ebenso für die Expression von *mcpt4* (vgl. Abbildung 9D).

Zusammengefasst verdeutlichen diese Ergebnisse, dass immobilisiertes VCAM-1 die Proliferation von MZ auslöst. Die ist vergleichbar mit der durch 10 ng/ml SCF induzierten Proliferation. Des Weiteren zeigen die Daten, dass VCAM-1 die SCF-induzierte MZ Proliferation verstärkt. Eine Differenzierung der BMC MC, vergleichbar mit der durch Fb induzierten, war nicht festzustellen.

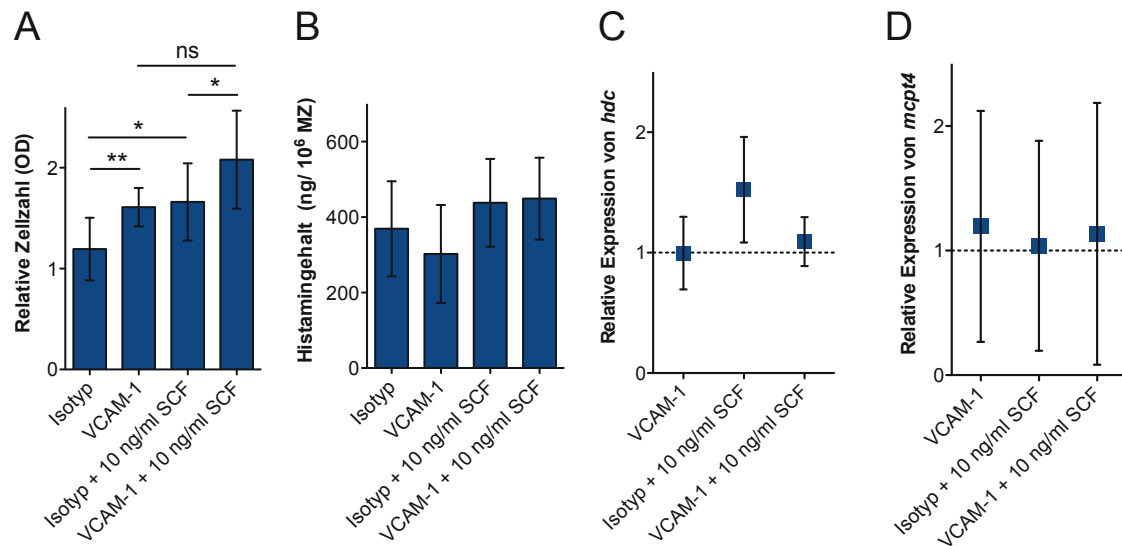


Abbildung 9: Immobilisiertes VCAM-1 induziert die Proliferation aber nicht die Differenzierung von MZ

BMCMC wurden mit immobilisiertem VCAM-1 oder der Isotypkontrolle jeweils mit und ohne SCF kultiviert. (A) Die MZ Proliferation wurde anhand der OD bei 490 nm unter Verwendung des *CellTiter 96® Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay* (MTS, Promega) an Tag 7 bestimmt. Die Daten sind als MW \pm SD aus 5 unabhängigen Experimenten dargestellt (jeweils in Dreifachbestimmung, ** $P < 0,01$; * $P < 0,05$; ns nicht signifikant $P > 0,05$; *Student's T-Test*). (B) Gezeigt ist der Histamingehalt für die unterschiedlichen Ansätze pro 10^6 MZ an Tag 11 der Kultivierung. Die Daten aus drei unabhängigen Experimenten sind als MW \pm SD präsentiert. Es gibt keine signifikanten Unterschiede (*Student's T-Test*). (C) + (D) Relative Expression der Transkripte *hdc* und *mcpt4* am Tag 11 im Vergleich zur Isotypkontrolle, welche als 1 festgelegt wurde (gestrichelte Linie). Die Expressionsraten wurden anhand der Expression des Haushaltsgens *hprt* normiert. Die Daten aus drei unabhängigen Experimenten sind als MW \pm SD dargestellt. Es gibt keine signifikanten Unterschiede (*Student's T-Test*).

4.4 Von Swiss Albino 3T3 Fibroblasten exprimiertes SCF²⁴⁸ verbleibt in der membranständigen Form

Da die Interaktion von VCAM-1 und $\alpha_4\beta_7$ -Integrin allein nicht zu einer Veränderung des MZ-Phänotyps führte, wurde die Hypothese aufgestellt, dass sie lediglich den Kontakt zu dem hierfür entscheidenden Mediator auf der Fb-Zelloberfläche gewährleistet. Als entscheidender Mediator kommt membranständiges SCF auf den Fb in Frage. Es ist bereits hinreichend bekannt, dass SCF neben einer Reihe von anderen Effekten auch die Differenzierung von MZ auslösen kann [100, 101]. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass membranständiges SCF, im Vergleich zu löslichem SCF, zu einer nachhaltigeren Aktivierung seines Rezeptors Kit führt [107]. Deshalb wurde zunächst mittels RT-PCR und ELISA überprüft, welche SCF-Variante von den verwendeten Swiss Albino 3T3 Fibroblasten exprimiert wird.

4.4.1 Swiss Albino 3T3 Zelllinie exprimiert lösliches SCF²⁴⁸

Es kommen zwei Splicevarianten von SCF vor, wobei die Variante SCF²⁴⁸ durch proteolytische Spaltung lösliches SCF freisetzt und SCF²²⁰ meist membranständig verbleibt. Bei der Variante SCF²²⁰ wird das Exon 6, welches proteolytische Schnittstellen codiert, nicht exprimiert [105]. Daher wurden die Primersequenzen so gewählt, dass sie das Exon 6 einschließen. Somit konnte über die Fragmentlänge des PCR-Produktes die von den Fb exprimierte Splicevariante identifiziert werden. Abbildung 10A zeigt die Produktbanden nach der RT-PCR zweier verschiedenener Fb RNA-Proben, welche repräsentative Ergebnisse von insgesamt vier Versuchen darstellen, jeweils in Doppelbestimmung. Das amplifizierte Fragment hatte eine Länge von weniger als 200 bp, was dem PCR-Fragment inklusive Exon 6 mit einer Länge von 192 bp entspricht. Dies zeigt, dass die Fb der Swiss Albino 3T3 Zelllinie die sogenannte lösliche SCF-Variante SCF²⁴⁸, welche die Protease-Schnittstellen enthält, exprimiert. Ein Fragment der Größe 108 bp wurde nicht nachgewiesen. Dies zeigt, dass die zweite Splicevariante ohne Exon 6 von den untersuchten Fb nicht exprimiert wird.

4.4.2 Die Überstände der Cokultur enthalten kein lösliches SCF

Da die RT-PCR zeigte, dass die verwendete Fibroblastenzelllinie Swiss Albino 3T3 die sogenannte lösliche Variante des SCF exprimiert, wurden die Zellkulturüberstände mittels ELISA auf ihren SCF-Gehalt untersucht. Wie Abbildung 10B zeigt, konnte in den Überständen von BMCMC und Cokulturen kein SCF detektiert werden. Die SCF-Konzentrationen, die in den Überständen von Fb und Insert-Cokulturen gemessen wurden, sind sehr gering. In der Insert-Cokultur wurde an Tag 3 kein SCF detektiert, hingegen enthielten die Überstände an Tag 7 durchschnittlich $42,9 \pm 66,5$ pg/ml und an Tag 11 der Kultur $68,4 \pm 79,1$ pg/ml. Die Fb-Kulturen enthielten $20,2 \pm 49,4$ pg/ml an Tag 3, $106,7 \pm 86,4$ pg/ml an Tag 7 und $127,4 \pm 69,1$ pg/ml SCF an Tag 11 der Kultur. Diese Ergebnisse deuten an, dass das von den Fb exprimierte SCF kaum proteolytisch abgespalten wird, sondern in seiner membranständigen Form verbleibt.

Um zu überprüfen ob SCF auf Proteinebene und membranständig exprimiert wird, wurden die Totallysate, die Cytoplasma-Fraktionen und die Membranfraktionen der Fb mittels Westernblot analysiert. Dabei wurden zwei spezifische Produktbanden mit 36 kDa bzw. etwa 65 kDa mit dem anti-SCF Antikörper sowohl in den Totallysaten als auch in den Membranfraktionen nachgewiesen (nicht gezeigt).

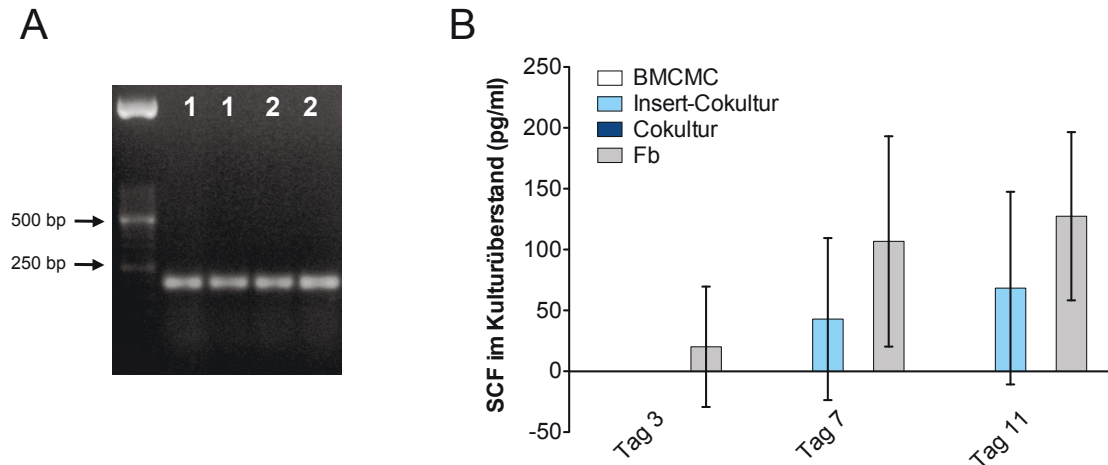


Abbildung 10: Das von Fb exprimierte SCF²⁴⁸ verbleibt auf der Zellmembran

(A) Repräsentatives Ergebnis der RT-PCR für das Transkript *scf²⁴⁸* von Proben der Swiss Albino 3T3 Fibroblasten. Gezeigt sind die Produktbanden der RT-PCR im Agarosegel aus einem repräsentativen von insgesamt 4 Experimenten. (B) SCF-Gehalt in den Überständen der verschiedenen Ansätze (BMCMC, Insert-Cokultur, Cokultur und Fb) an den Tagen 3, 7 und 11 der Kultur. Die Daten wurden mittels ELISA ermittelt und sind als MW \pm SD dargestellt (n=6).

4.5 Der SCF-Rezeptor Kit ist ein entscheidender aber nicht ausschließlicher Mediator der Fb-induzierten Effekte auf MZ

Da die bisherigen Ergebnisse darauf hindeuten, dass membranständiges SCF auf Fb für die gesteigerte Proliferation und die Differenzierung der MZ zu reifen CTMC verantwortlich sein könnte, wurden nun MZ untersucht, die für den SCF-Rezeptor Kit defizient sind. Dazu wurden MZ aus dem Knochenmark von C57BL/6 *Kit^{W-sh/W-sh}* Mäusen generiert und in gleicher Weise, wie die Wildtyp MZ, mit Fb cokultiviert. Diese MZ exprimieren kein Kit, da die C57BL/6 *Kit^{W-sh/W-sh}*-Mäuse eine Inversionsmutation im regulatorischen Bereich des *kit* Gens tragen, die zu einer Defizienz von Kit in MZ und Melanozyten führt [144–146].

4.5.1 In Cokultur mit Fb ist die Proliferation von Kit-defizienten *Kit^{W-sh/W-sh}*-BMCMC deutlich geringer als die von Wildtyp-BMCMC

Auch die Kit-defizienten *Kit^{W-sh/W-sh}*-MZ proliferierten in allen Ansätzen während der untersuchten 11-tägigen Cokultur (vgl. Abbildung 11A). An Tag 3 der Cokultur war die Zellzahl der *Kit^{W-sh/W-sh}*-CokuMZ mit $1,7 \pm 0,5 \times 10^6$ MZ/Kavität nicht signifikant höher als die Zahl der *Kit^{W-sh/W-sh}*-BMCMC mit $1,2 \pm 0,3 \times 10^6$ MZ/Kavität. An Tag 7 der Cokultur jedoch war die Anzahl der *Kit^{W-sh/W-sh}*-CokuMZ mit $4,2 \pm 1,6 \times 10^6$ MZ/Kavität, gegenüber der Zellzahl der *Kit^{W-sh/W-sh}*-BMCMC mit $3,0 \pm 0,9 \times 10^6$ MZ/Kavität, deutlich erhöht. Ohne direkten Zellkontakt von MZ und Fb (InMZ) kam es mit $1,1 \pm 0,3 \times 10^6$ MZ/Kavität an Tag 3 und $2,6 \pm 0,8 \times 10^6$ MZ/Kavität an

Tag 7 nicht zu einer derartigen Steigerung der MZ-Zahlen, im Vergleich zur Kontrolle. Am Tag 11 des Experiments waren die Zellzahlen in der Cokultur mit $5,5 \pm 3,8 \times 10^6$ MZ/Kavität und im Insert mit $5,5 \pm 2,6 \times 10^6$ MZ/Kavität geringer als in der Kontrolle mit $8,1 \pm 4,5 \times 10^6$ MZ/Kavität. Da die Zellzahlen der verschiedenen Cokultur-Ansätze starke Schwankungen aufwiesen, wurden die Daten schließlich normalisiert, wobei die Zellzahlen der BMC MC jeweils auf 100 % gesetzt wurden (vgl. Abbildung 11B).

Die Zellzahlen von *Kit^{W-sh/W-sh}*-CokuMZ waren mit $150,2 \pm 17,5$ % an Tag 3 und $145,7 \pm 33,0$ % an Tag 7 der Kultur, gegenüber den Kontrollen, signifikant erhöht ($P < 0,001$). An Tag 11 der Kultur betrug die Zellzahl der *Kit^{W-sh/W-sh}*-CokuMZ nur $67,7 \pm 20,4$ % der Kontrolle und war damit signifikant geringer als diese ($P < 0,01$).

Der Vergleich der Zellzahlen der *Kit^{W-sh/W-sh}*-CokuMZ ($150,2 \pm 17,5$ %) mit denen der *Kit^{+/+}*-CokuMZ ($189,3 \pm 41,8$ %) an Tag 3 zeigt, dass sie im Vergleich zu den Kontrollen gleichermaßen stark erhöht waren. An Tag 7 der Kultur hingegen war die Anzahl der *Kit^{+/+}*-CokuMZ gegenüber der Kontrolle um das vierfache erhöht ($425,3 \pm 123,0$ %), während die Anzahl der *Kit^{W-sh/W-sh}*-CokuMZ nur das eineinhalbfache der Kontrolle ($145,7 \pm 33,0$ %) betrug. Damit war die Anzahl der *Kit^{W-sh/W-sh}*-CokuMZ an Tag 7 signifikant geringer ($P < 0,001$) als die Anzahl der *Kit^{+/+}*-CokuMZ.

Im Vergleich zu den Zahlen der ohne Zellkontakt zu den Fb kokultivierten *Kit^{W-sh/W-sh}*-InMZ (Tag 3: $94,71 \pm 7,40$ %, Tag 7: $86,5 \pm 7,2$ %), waren die Zellzahlen der *Kit^{W-sh/W-sh}*-CokuMZ an Tag 3 und Tag 7 jedoch deutlich erhöht ($P < 0,001$). An Tag 11 der Cokultur unterschieden sich die Zellzahlen der *Kit^{W-sh/W-sh}*-InMZ mit $71,2 \pm 8,9$ % und der *Kit^{W-sh/W-sh}*-CokuMZ ($67,7 \pm 20,4$ %) nicht von einander ($P > 0,05$). Sie waren signifikant geringer als die Kontrolle ($P < 0,01$). Insgesamt deuten diese Ergebnisse einerseits auf eine bedeutende Rolle des SCF-Rezeptors Kit bei der kontaktabhängigen Fb-induzierten Proliferation der MZ hin, andererseits auch auf einen Kit-unabhängigen kontaktabhängigen Signalweg.

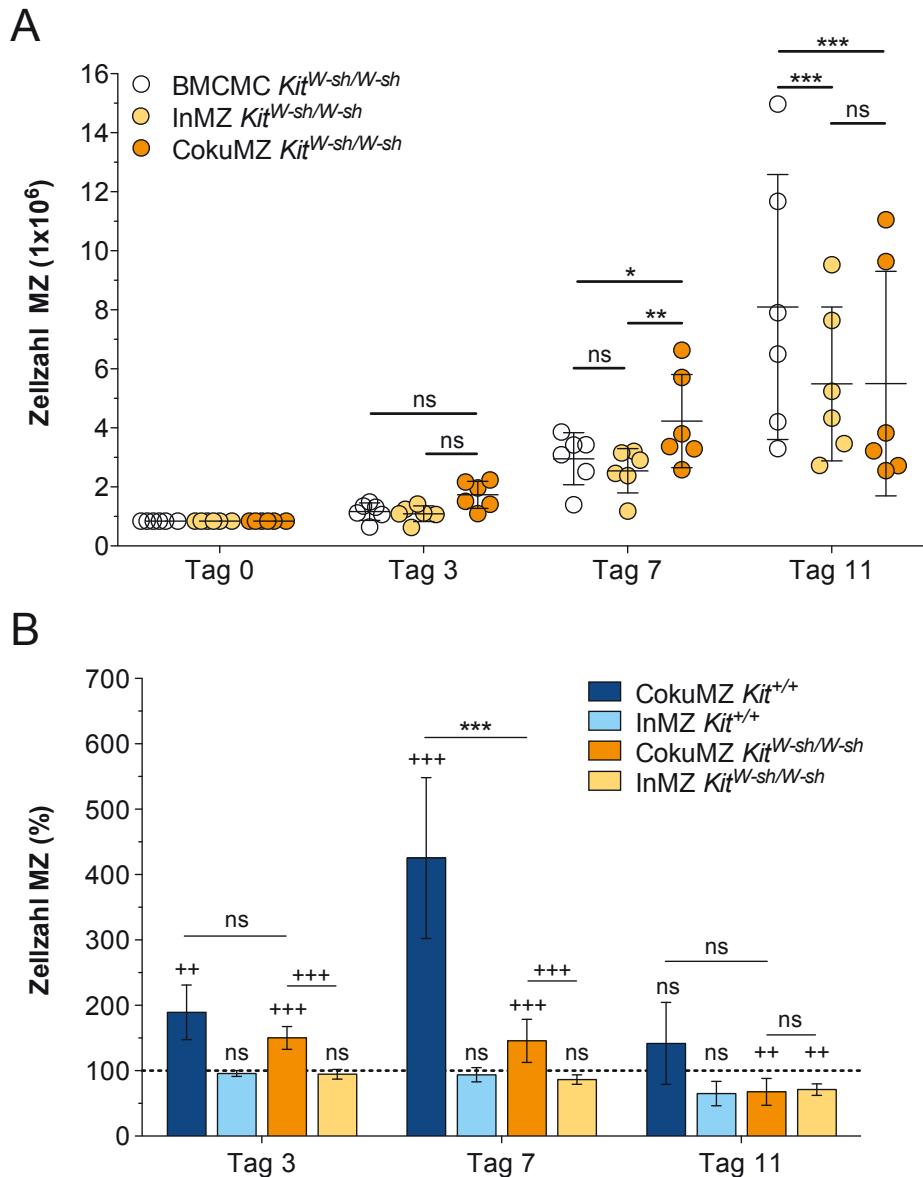


Abbildung 11: Fb-induzierte kontaktabhängige MZ-Proliferation ist in *Kit*^{W-sh/W-sh}-MZ verringert

(A) Anzahl der vitalen *Kit*-defizienten MZ pro Kavität in den Kontrollen (BMCMC), den kokultivierten MZ mit Zellkontakt (CokuMZ) und ohne Zellkontakt zu den Fb (InMZ) an den Tagen 0, 3, 7 und 11 der Kokultur. Die Daten von 6 unabhängigen Experimenten sind als Einzelergebnisse mit MW (horizontale Linie) \pm SD gezeigt (** $P < 0,001$; ** $P < 0,01$; ns nicht signifikant $P > 0,05$; *Two-Way ANOVA* mit *Bonferroni-Test*). (B) Relative Anzahl der CokuMZ und InMZ beider Genotypen im Vergleich zur Anzahl der BMCMC gleichen Genotyps, welche als Kontrolle diente und als 100 % (gestrichelte Linie) festgelegt wurde. Die Zellzahlen der *Kit*^{W-sh/W-sh}-Kontrollen betrugen $1,2 \times 10^6 \pm 0,3 \times 10^5$ an Tag 3, $3,0 \times 10^6 \pm 0,9 \times 10^5$ an Tag 7 und $8,1 \times 10^6 \pm 4,5 \times 10^5$ an Tag 11 der Kultur. Die Zellzahlen der *Kit*^{+/+}-Kontrollen betrugen $9,6 \pm 1,5 \times 10^5$ an Tag 3, $2,5 \times 10^6 \pm 7,7 \times 10^5$ an Tag 7 und $9,5 \times 10^6 \pm 4,6 \times 10^5$ an Tag 11 der Kultur. Die Ergebnisse von insgesamt 6 unabhängigen Experimenten sind als MW \pm SD dargestellt (Vergleich von Gruppen des gleichen Genotyps *** $P < 0,001$; ** $P < 0,01$; ns nicht signifikant $P > 0,05$; *Two-Way ANOVA* mit *Bonferroni-Test* und Vergleich von Gruppen unterschiedlicher Genotypen *** $P < 0,001$; ** $P < 0,01$; ns nicht signifikant $P > 0,05$; *Two-Way ANOVA* mit *Bonferroni-Test*).

4.5.2 Die Fb-induzierte MZ-Differenzierung ist nicht ausschließlich Kit-abhängig

4.5.2.1 Die Expression von *hdc* und *mcpt4* durch *Kit*^{W-sh/W-sh}-CokuMZ ist im Vergleich zu der durch Wt-CokuMZ verändert

Das Bandenmuster in Abbildung 12A zeigt ein repräsentatives Ergebnis der Expressionsanalyse für *hdc* und *mcpt4* mittels RT-PCR von entsprechenden RNA-Proben der Kit-defizienten *Kit*^{W-sh/W-sh}-MZ nach 11 Tagen Kultur. Es konnte gezeigt werden, dass auch die Kit-defizienten MZ *hdc* und *mcpt4* exprimieren. Die Intensitäten der Produktbanden deuten darauf hin, dass der direkte Kontakt zu Fb die Expression beider Enzyme verstärkt, die Cokultur mit Fb ohne Zellkontakt hingegen nicht. Um eine genauere Aussage darüber treffen zu können, wurden die Expressionsniveaus zusätzlich mittels RTq-PCR quantitativ analysiert (vgl. Abbildung 12B). Die *Kit*^{W-sh/W-sh}-CokuMZ zeigten mit einer relativen Expression von $195,9 \pm 15,5$ eine 200-fache Steigerung der *mcpt4*-Expression im Vergleich zur Kontrolle (relative Expression=1). Interessanterweise war diese Steigerung der Expression jedoch deutlich geringer ($P < 0,05$) als jene, die in den Wt-CokuMZ induziert wurde ($462,2 \pm 134,3$). Die *Kit*^{W-sh/W-sh}-InMZ ($2,3 \pm 0,6$) wiesen eine derartige Steigerung des Expressionslevels von *mcpt4* nicht auf ($P < 0,0001$). Sie waren diesbezüglich mit den Wt-InMZ ($2,7 \pm 1,1$) vergleichbar ($P > 0,05$). Etwas anders verhielt es sich mit der Expression der *hdc*. In den *Kit*^{W-sh/W-sh}-CokuMZ ($45,0 \pm 22,3$) führte der direkte Kontakt zu den Fb zu einer deutlichen Steigerung der *hdc*-Expression ($P < 0,05$) im Vergleich zur Kontrolle. Anders als bei der *mcpt4*, war die Expression der *hdc* von *Kit*^{W-sh/W-sh}-CokuMZ mit der von Wt-CokuMZ ($28,0 \pm 13,7$; $P > 0,05$) vergleichbar. Die *Kit*^{W-sh/W-sh}-InMZ ($2,5 \pm 0,4$) wiesen eine solche deutliche Verstärkung der *hdc* Expression nicht auf. Interessanterweise wurde *hdc* von *Kit*^{W-sh/W-sh}-InMC etwa zweifach stärker exprimiert als von den Wt-InMC (Wt-InMC $1,3 \pm 0,11$; *Kit*^{W-sh/W-sh}-InMC $2,5 \pm 0,4$; $P < 0,01$). Insgesamt jedoch zeigen diese Daten, dass durch den direkten Zellkontakt zu Fb die Differenzierung von Kit-defizienten MZ ausgelöst wird, wenn auch zu einem geringeren Ausmaß verglichen mit Kit-kompetenten Wt-MZ.

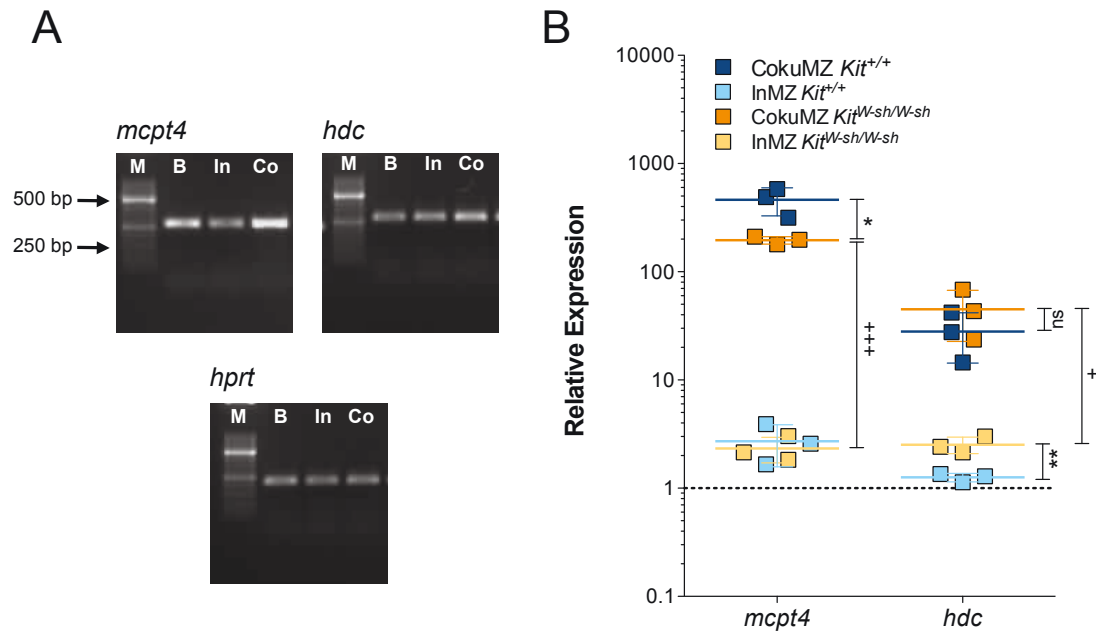


Abbildung 12: Die Fb-induzierte Hochregulation der Expression von *hdc* und *mcpt4* ist nicht ausschließlich Kit-abhängig

(A) Repräsentative Ergebnisse der RT-PCR für die Transkripte *mcpt4*, *hdc* und *hprt* (Haushaltsgen) von Proben der Kit-defizienten *Kit*^{W-sh/W-sh}-BMC MC (B), -InMZ (In) und -CokuMZ (Co) nach 11 Tagen Kultur. Gezeigt sind der Marker (M) und die Produktbanden der RT-PCR im Agarosegel, aus einem von insgesamt 6 Experimenten. (B) Relative Expression der Transkripte *mcpt4* und *hdc* am Tag 11 der Kokultur in InMZ und CokuMZ beider Genotypen im Vergleich zur Kontrolle (BMC MC), welche als 1 festgelegt wurde (gestrichelte Linie). Die Expressionsraten wurden anhand der Expression des Haushaltsgens *hprt* normiert. Die Ergebnisse von drei unabhängigen Experimenten sind als Einzelwerte mit MW \pm SD dargestellt (Vergleich von Gruppen des gleichen Genotyps *** P < 0,001; + P < 0,05; ns nicht signifikant P > 0,05; Student's T-Test und Vergleich von Gruppen verschiedenen Genotyps ** P < 0,01; * P < 0,05; ns nicht signifikant P > 0,05; Student's T-Test).

4.5.2.2 Der Histamingehalt von *Kit*^{W-sh/W-sh}-CokuMZ ist geringer als der von Wildtyp-CokuMZ

Nach 3 Tagen Kokultur gab es, wie Abbildung 13 zeigt, bezüglich des Histamingehaltes pro 1×10^6 MZ keine Unterschiede zwischen den *Kit*^{W-sh/W-sh}-CokuMZ mit $594,07 \pm 266,7$ ng und den *Kit*^{W-sh/W-sh}-InMZ mit $756,1 \pm 317,1$ ng (P > 0,05). Auch zu den Zahlen der Wt-CokuMZ mit $261,8 \pm 130,7$ ng bestand kein signifikanter Unterschied (P > 0,05). Nach 7 Tagen konnten signifikante Unterschiede bei den *Kit*^{W-sh/W-sh}-CokuMZ mit $751,1 \pm 270,0$ ng/ 10^6 MZ im Vergleich zu den *Kit*^{W-sh/W-sh}-InMZ mit $503,7 \pm 339,9$ ng/ 10^6 MZ festgestellt werden (P < 0,01). Dabei unterschied sich der Histamingehalt der *Kit*^{W-sh/W-sh}-CokuMZ jedoch nicht signifikant von dem der Wt-CokuMZ mit $919,8 \pm 423,5$ ng/ 10^6 MZ (P > 0,05). An Tag 11 der Kokultur war der Histamingehalt der *Kit*^{W-sh/W-sh}-CokuMZ mit $921,3 \pm 345,5$ ng/ 10^6 MZ im Vergleich zu dem der *Kit*^{W-sh/W-sh}-InMZ mit $451,2 \pm 398,6$ ng/ 10^6 MZ noch weiter erhöht (P < 0,001). Interessanterweise enthielten die *Kit*^{W-sh/W-sh}-CokuMZ damit jedoch deutlich weniger Histamin als die Wt-CokuMZ mit $1721,5 \pm 960,1$ ng/ 10^6 (P < 0,001). Diese Ergebnisse deuten an, dass der Fb-induzierte

Anstieg des Histamingehaltes der MZ ebenfalls zum großen Teil auf eine SCF/Kit-Interaktion zurückzuführen ist, weisen jedoch auf einen zweiten kontaktabhängigen, Kit-unabhängigen Signalweg hin.

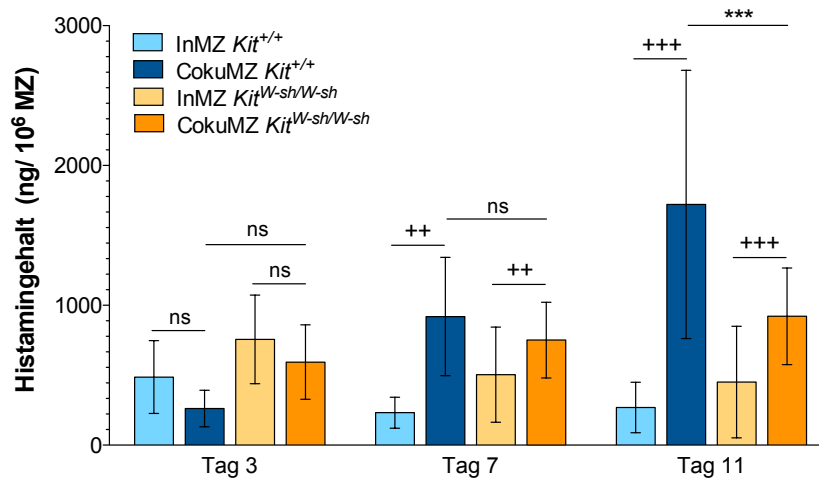


Abbildung 13: Die Fb-induzierte Steigerung des Histamingehaltes ist nicht ausschließlich Kit-abhängig

Histamingehalt pro 1×10^6 MZ in den kokultivierten Kit-kompetenten Wt-MZ und Kit-defizienten *Kit*^{W-sh/W-sh}-MZ mit Zellkontakt (CokuMZ) und ohne Zellkontakt zu den Fb (InMZ) an den Tagen 0, 3, 7 und 11 der Kokultur. Die Ergebnisse von 6 unabhängigen Experimenten sind als MW \pm SD dargestellt (Vergleich von Gruppen des gleichen Genotyps *** $P < 0,001$; ** $P < 0,01$; ns nicht signifikant $P > 0,05$; Two-Way ANOVA mit Bonferroni-Test und Vergleich von Gruppen verschiedenen Genotyps (***) $P < 0,001$; ns nicht signifikant $P > 0,05$; Two-Way ANOVA mit Bonferroni-Test).

4.5.3 Während der erstmaligen Besiedelung der Haut ist die Anzahl dermalen MZ in *Kit*^{W-sh/W-sh}-Mäusen deutlich verringert

Um zu ermitteln inwieweit SCF/Kit-Wechselwirkungen die Besiedelung der Haut durch Mastzell-Vorläufer und deren anschließende Differenzierung zu reifen Bindegewebs-MZ beeinflussen, wurde die Anzahl dermalen MZ in der Haut von Wt- und *Kit*^{W-sh/W-sh}-Mausfeten untersucht (vgl. Abbildung 14). Am Tag 14 der Embryonalentwicklung konnten weder in der Dermis von Wt- noch in der von *Kit*^{W-sh/W-sh}-Mausfeten reife MZ nachgewiesen werden. Am Tag 16 wurden $575,0 \pm 35,7$ dermale MZ pro Schnitt in der Rückenhaut von Wt-Feten nachgewiesen, in *Kit*^{W-sh/W-sh}-Feten mit $86,4 \pm 12,4$ dermalen MZ pro Schnitt jedoch deutlich weniger ($P < 0,0001$). Diese Ergebnisse zeigen die Relevanz des SCF-Rezeptors Kit bei der Besiedelung der Haut mit MZ und deuten zudem an, dass neben SCF weitere Fb-assoziierte Faktoren eine Rolle bei der Differenzierung zu reifen Bindegewebs-MZ spielen könnten.

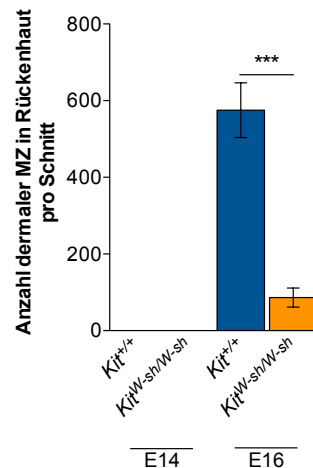


Abbildung 14: Die Anzahl dermalen MZ ist in *Kit*^{W-sh/W-sh}-Feten deutlich verringert

Die Anzahl dermalen MZ in der Rückenhaut von C57BL/6-*Kit*^{+/+}- und C57BL/6-*Kit*^{W-sh/W-sh}-Mausfeten wurden an Tag 14 bzw. 16 der Embryonalentwicklung, quantitativ histomorphometrisch anhand von 3-10 Giemsa-gefärbten Paraffinschnitten pro Fötus ermittelt. Pro Genotyp wurden insgesamt vier Feten analysiert. Die Daten sind als MW ± SD gezeigt mit *** $P < 0,0001$; *Student's T-Test*).

4.6 Das Adhäsionsverhalten von Kit-defizienten BMCMC ist mit dem von Wildtyp-BMCMC vergleichbar

Sowohl die Induktion der Proliferation als auch die Differenzierung der MZ hängen von der Adhäsion der MZ an die Fb ab. Da beides in Kit-defizienten *Kit*^{W-sh/W-sh}-MZ verringert war, wurde untersucht, ob das Adhäsionsverhalten der *Kit*^{W-sh/W-sh}-MZ im Vergleich zu dem der Wt-MZ verändert ist.

Zunächst wurde die Expression der Adhäsionsmoleküle CD49d (α_4), CD29 (β_1), β_7 , CD11b (α_M), CD51 (α_V), CD61 (β_3), CD31 (PECAM-1) und CD54 (ICAM-1) von *Kit*^{W-sh/W-sh}-BMCMC durchflusszytometrisch analysiert und mit der Expression von *Kit*^{+/+}-BMCMC verglichen. Dabei konnten keine Unterschiede zwischen den BMCMC der beiden Genotypen festgestellt werden (vgl. Abbildung 15A). Wie die Abbildung 15B verdeutlicht, unterschieden sich die Anzahl der an Fb adhärennten *Kit*^{W-sh/W-sh}-BMCMC ($26,2 \pm 10,9$ /Kavität) nach 30 min Inkubation nicht von der Anzahl der an Fb adhärennten *Kit*^{+/+}-BMCMC ($23,0 \pm 6,4$ /Kavität; $P > 0,05$).

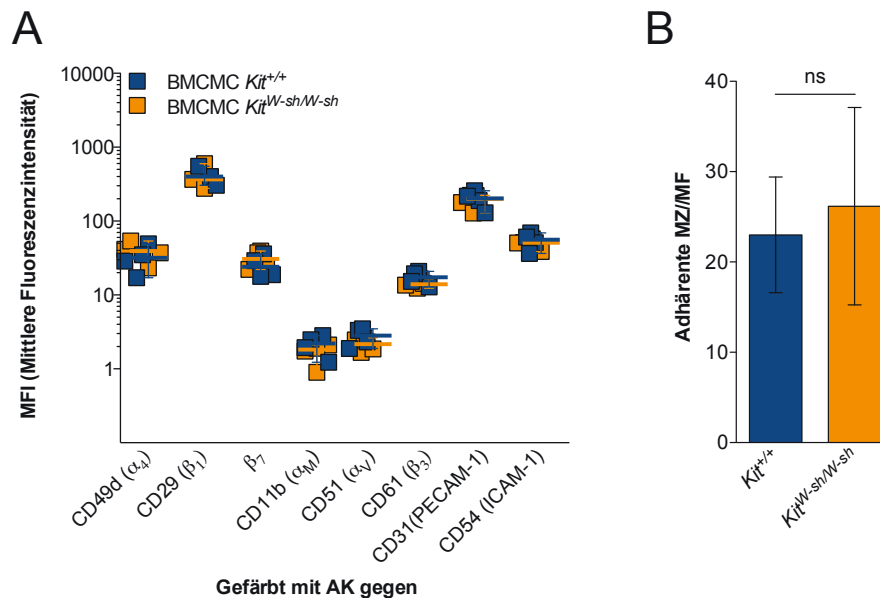


Abbildung 15: Die Kit-Defizienz beeinträchtigt die Adhäsion von $Kit^{W-sh/W-sh}$ -BMCMC an Fb nicht

(A) MFI der BMCMC, nach Färbung der verschiedenen Adhäsionsmoleküle mit den entsprechenden Antikörpern. Die Daten sind als Einzelergebnisse mit MW (Linie) und SD gezeigt (n=3 für CD29, alle anderen n=4; keine signifikanten Unterschiede; ANOVA mit *Bonferroni Test*). (B) Relative Anzahl der adhärenen MZ an Fibroblasten. Die Daten von vier unabhängigen Experimenten sind als MW \pm SD gezeigt (keine signifikanten Unterschiede, *Student's T-Test*).

Wie die Blockierungsversuche verdeutlichen, wurde die Adhäsion an Fb auch bei Kit-defizienten $Kit^{W-sh/W-sh}$ -BMCMC zum Teil durch eine Wechselwirkung von VCAM-1 auf Fb und $\alpha_4\beta_7$ auf MZ vermittelt (vgl. Abbildung 16A und B). Die Anzahl adhärenen $Kit^{W-sh/W-sh}$ -MZ war nach der Blockierung mittels anti- α_4 mit $42,2 \pm 16,3$ % im Vergleich zur Isotypkontrolle mit $74,3 \pm 14,9$ % deutlich reduziert ($P < 0,01$), wobei die Anzahl adhärenen unbehandelter BMCMC an Fb als 100 % gesetzt wurde. Dabei unterschieden sich die Zahlen nicht signifikant von denen, die nach gleicher Behandlung mit Wt-BMCMC ermittelt wurden (anti- α_4 $36,3 \pm 22,6$ %, Isotyp $76,1 \pm 20,2$ %). Auch die Blockierung von β_7 -Integrinen führte mit $47,0 \pm 19,2$ % adhärenen $Kit^{W-sh/W-sh}$ -BMCMC, im Vergleich zur Isotypkontrolle mit $68,5 \pm 12,6$ % adhärenen $Kit^{W-sh/W-sh}$ -BMCMC, zu einer Reduktion der Anzahl adhärenen MZ ($P < 0,05$). Hierbei waren die Werte ebenfalls mit denen der Wt-BMCMC vergleichbar (anti- β_7 $42,9 \pm 16,1$ %, Isotyp $59,1 \pm 20,5$ %). Wie bei den Ergebnissen für die Wt-BMCMC bestand kein signifikanter Unterschied zwischen der Anzahl der adhärenen $Kit^{W-sh/W-sh}$ -BMCMC, die mit Antikörpern gegen β_1 blockiert ($64,6 \pm 35,0$ %) und denen, die mit der korrespondierenden Isotypkontrolle ($149,9 \pm 108,1$ %) inkubiert wurden ($P > 0,05$). Auch hier gab es keine Unterschiede zu den jeweiligen Werten für Wt-MZ (anti- β_1 $60,5 \pm 34,4$ %, Isotyp $95,9 \pm 38,8$ %). Diese Daten zeigen, dass die Kit-Defizienz von $Kit^{W-sh/W-sh}$ -BMCMC die Adhäsion an Fb nicht beeinträchtigt.

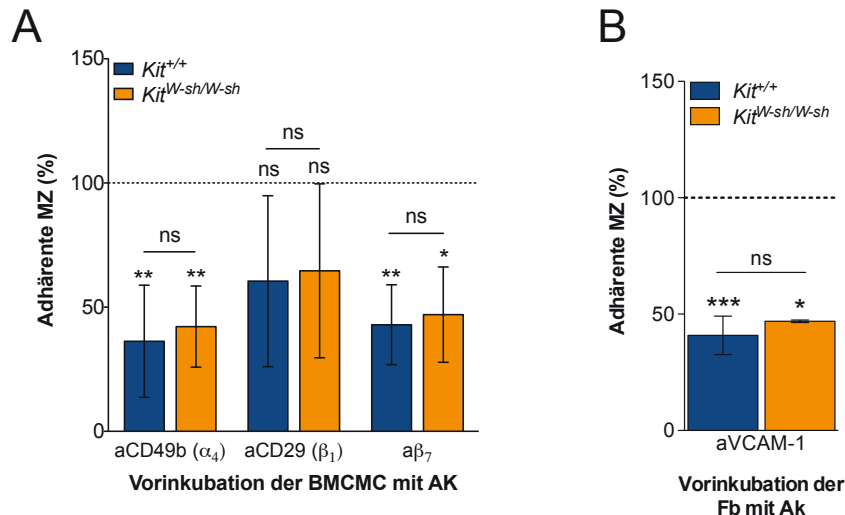


Abbildung 16: Die Adhäsion von *Kit*^{W-sh/W-sh}-BMCMC an Fb ist vergleichbar mit der von Wt-BMCMC

Relative Anzahl der adhärenen MZ an Fb nach Blockade der verschiedenen Adhäsionsmoleküle auf den BMCMC (A) bzw. der Fb (B), im Vergleich zur unblockierten Kontrolle, welche als 100 % (gestrichelte Linie) festgelegt wurde. Die Daten sind als MW ± SD gezeigt (n=5 für aCD49b und aβ₇, n=4 für aCD29, n=3 für aVCAM-1; Vergleich zur Isotypkontrolle *** P<0,001; ** P<0,01; * P<0,05; ns nicht signifikant; *Student's T-Test*). Die relative Anzahl der adhärenen MZ an Fb für die entsprechenden Isotypkontrollen betrugen für *Kit*^{+/+}-BMCMC: 76,1 ± 20,2 % für aCD49b; 95,4 ± 38,8 % für aCD29; 59,1 ± 20,5 % für aβ₇ und 129,7 ± 22,8 % für aVCAM-1 bzw. für *Kit*^{W-sh/W-sh}-BMCMC: 74,3 ± 14,9 % für aCD49b; 149,9 ± 108,1 % für aCD29; 68,5 ± 12,6 % für aβ₇ und 122,9 ± 13,9 % für aVCAM-1.

4.7 Die Fb-induzierte Proliferation und -Differenzierung der MZ wird durch membranassoziierte Faktoren ausgelöst

Angesichts der Fülle von Fb Faktoren, die für die Kit-unabhängige Differenzierung der MZ ursächlich sein könnten, wurde zunächst untersucht, ob ein löslicher Mediator, dessen Freisetzung nur nach dem Kontakt von MZ zu Fb stattfindet, oder ein membranständiger Mediator verantwortlich ist. Dazu wurde ein spezieller Ansatz der Cokultur etabliert. Dabei wurden BMCMC in einem Transmembraneinsatz im Überstand von Cokulturen aus MZ und Fb kultiviert (spezial Insert MZ; spMZ), um den Einfluss von löslichen Mediatoren, die während der Cokultur freigesetzt werden, auf die BMCMC zu untersuchen.

Wie erwartet zeigten die CokuMZ beider Genotypen am Tag 7 der Kultur eine erhöhte relative Zellzahl mit 412,7 ± 178,2 % für *Kit*^{+/+} und 256,9 ± 138,1 % für *Kit*^{W-sh/W-sh}, im Vergleich zu den jeweiligen Kontroll-BMCMC (*Kit*^{+/+} P<0,01; *Kit*^{W-sh/W-sh} P<0,05), deren Zellzahl als 100 % angenommen wurde (vgl. Abbildung 17A und B). Die im Überstand der Cokultur kultivierten spMZ zeigten, im Vergleich zur Kontrolle, mit 114,3 ± 27,3 % für *Kit*^{+/+}-spMZ und 106,0 ± 38,3 % für *Kit*^{W-sh/W-sh}-spMZ keine gesteigerten Zellzahlen nach 7 Tagen Kultur (*Kit*^{+/+} P<0,01; *Kit*^{W-sh/W-sh} P<0,05). Am Tag 11 der Kultur gab es bezüglich der MZ-Zahlen keine signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen Ansätzen.

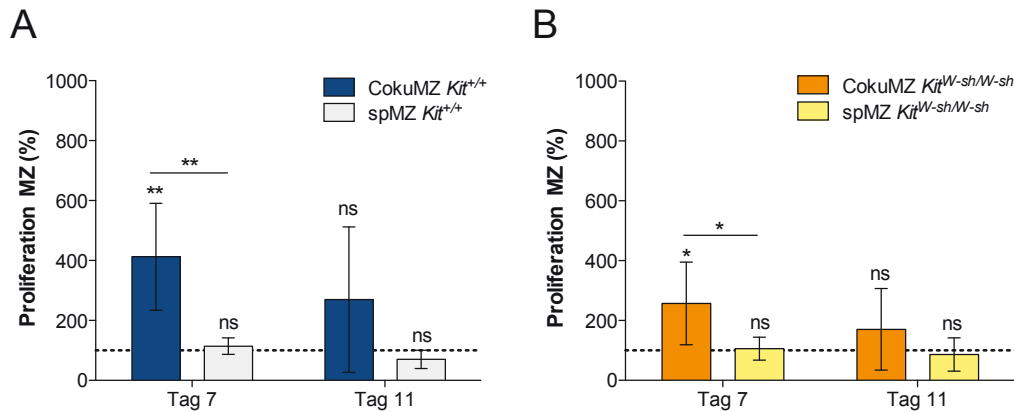


Abbildung 17: Die Fb-induzierte Proliferation von MZ wird nicht durch lösliche Faktoren ausgelöst

Proliferation der von *Kit*^{+/+} - (A) bzw. *Kit*^{W-sh/W-sh} - (B) CokuMZ und spMZ im Vergleich zur Proliferation der BMCMC, welche als Kontrolle diente und als 100 % (gestrichelte Linie) festgelegt wurden. Die Ergebnisse aus drei unabhängigen Experimenten sind als MW ± SD dargestellt (** P<0,01; * P<0,05; ns nicht signifikant P>0,05; Two-Way ANOVA mit Bonferroni-Test).

Um zu untersuchen, inwieweit die direkte Kontaktabhängigkeit auf die Fb-induzierte Differenzierung zutrifft, wurden die Expressionsniveaus von *mcpt4* und *hdc* mittels RTq-PCR quantitativ analysiert (vgl. Abbildung 18A und B). Die Expressionslevel von *mcpt4* und *hdc* der spMZ beider Genotypen unterschieden sich nicht von denen der jeweiligen InMZ und waren auch im Vergleich zu den Kontrollen (relative Expression=1) nicht signifikant erhöht. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass der gesuchte Faktor, der auch Kit-unabhängig eine gesteigerte MZ-Proliferation und -Differenzierung auslöst, ein membranständiger und kein löslicher Faktor ist, der nach Zellkontakt freigesetzt wird.

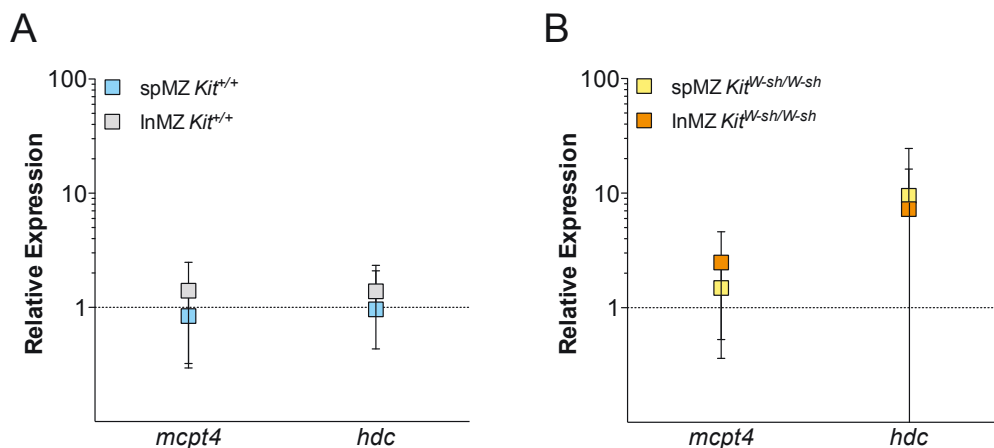


Abbildung 18: Die Fb-induzierte Differenzierung von MZ wird nicht durch lösliche Faktoren ausgelöst

Relative Expression der Transkripte *mcpt4* und *hdc* am Tag 11 der Cokultur in CokuMZ, InMZ und spMZ der Genotypen *Kit*^{+/+} (A) und *Kit*^{W-sh/W-sh} (B) im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle (BMCMC), welche als 1 festgelegt wurde (gestrichelte Linie). Die Expressionsraten wurden anhand der Expression des Haushaltsgens *hprt* normiert. Die Daten sind als Einzelwerte mit MW ± SD dargestellt (n=3, keine signifikanten Unterschiede P>0,05; ANOVA mit Bonferroni Test).

4.8 Genomweite Expressionsanalyse zur Fibroblasten-induzierten Mastzellen-Differenzierung

Um einen umfassenderen Eindruck von der Fb-induzierten Differenzierung der MZ zu erhalten, wurden die Transkriptome von BMCMC, von InMZ und von CokuMZ am Kulturtage 11 untersucht. Dazu wurde die mRNA der verschiedenen MZ aus insgesamt drei Ansätzen isoliert und mit der *Affymetrix Mouse Gene 1.0 ST Array* Technologie analysiert. Diese Technologie ermöglicht es, das Expressionsverhalten aller annotierten Gene im untersuchten Material zum selben Zeitpunkt zu analysieren. Durch diese Untersuchung konnte gezeigt werden, von welchen Genen die Expression durch die Cokultur mit Fb herauf- bzw. herunterreguliert wurde und inwieweit die jeweilige Veränderung vom direkten Zellkontakt abhing.

4.8.1 Kontaktabhängig regulierte Gene

Die Microarray-Analyse bestätigte, dass die Expression von *mcpt4* und *hdc* kontaktabhängig stark hoch reguliert wurden (vgl. Tabelle 9). Auch die Daten bezüglich der *mcpt5* und der *mc-cpa*, deren Expressionsniveaus unverändert blieben, konnten verifiziert werden.

Neben *mcpt4* wurden weitere Gene identifiziert, deren Expression nur nach direktem Kontakt mit Fb erhöht war. Beispielsweise waren die Expressionslevel des hoch-affinen Endothelin-1 Rezeptor A (*etar1*), des Hyaluronanrezeptor CD44, der Dopa Decarboxylase (*ddc*) und des *Vascular endothelial growth factor A* (*VEGFA*) in CokuMZ deutlich erhöht, in InMZ jedoch nicht. Dies gilt ebenso für die Gene für die Chemokine CCL (I-309), CCL9 (*Macrophage inflammatory protein-1 γ* , MIP-1 γ), CXCL2 (MIP-2) und CXCL10 (*Interferon gamma-induced protein 10 kDa*, IP-10).

Des Weiteren konnte eine kontaktabhängige Herabregulierung der Expression verschiedener Gene gezeigt werden. Beispielsweise wurde die Expression von Integrin β_7 und der Chemokinrezeptoren CXCR2 und CX3CR1 (Fractalkine Rezeptor) durch den Kontakt mit Fb herunterreguliert.

4.8.2 Kontaktunabhängig regulierte Gene

Zu den Genen, deren Expressionslevel durch die Cokultur von MZ ohne den direkten Zellkontakt mit den Fb verändert waren, zählen beispielsweise die Gene für CXCR4, den Rezeptor für das Chemokin *stromal cell derived factor-1 α* (SDF-1 α) sowie für die Integrine α_M (*itgam*) und β_2 (*itgb2*). Wie die Daten in Tabelle 9 verdeutlichen, wurde *cxc4* von den InMZ stärker exprimiert als von den BMCMC. In den CokuMZ hingegen war die Expression von *cxc4* im Vergleich zu den BMCMC unverändert. Anders verhielt es sich mit den Expressionsniveaus von *itgam* und *itgb2*. Deren Expression war in InMZ und in CokuMZ gleichermaßen erhöht.

Tabelle 9: Auswahl von Genen mit veränderter Expression nach 11 Tagen Kokultur ermittelt durch Analyse mit *Affymetrix Mouse Gene 1.0 ST Array*

Gen Abkürzung	Bezeichnung des Gens	Accession number (NCBI Datenbank)	-fache Änderung CokuMZ vs. InMZ	P-Wert	-fache Änderung CokuMZ vs. BMC/MC	P-Wert	-fache Änderung InMZ vs. BMC/MC	P-Wert
Gene die mit der MZ Differenzierung assoziiert sind								
Mcp4	Mastzell Protease 4	NM_010779	62,94 ↑	0,00002	61,29 ↑	0,00001	1,03	0,90150
Hdc	Histidin Decarboxylase	NM_008230	9,51 ↑	0,00005	9,60 ↑	0,00020	-1,01	0,96845
Ednra	Endothelinrezeptor Typ A	NM_010332	5,20 ↑	0,00039	4,91 ↑	0,00008	1,06	0,73307
Ddc	Dopa Decarboxylase	NM_016672	2,45 ↑	0,00053	4,26 ↑	0,00023	-1,74	0,00307
Cd44	CD44 Antigen	NM_009851	2,21 ↑	0,00132	2,21 ↑	0,00358	-1,00	0,98477
Gene die mit der Rekrutierung und Migration von MZ Vorläufern und MZ assoziiert sind								
Il8rb	Interleukin-8 Rezeptor Beta	NM_009909	-2,02 ↓	0,00007	-5,08 ↓	0,04792	2,52	0,18387
Cx3cr1	Chemokin (C-X3-C Motiv) Rezeptor 1	NM_009987	-4,46 ↓	0,00154	-3,74 ↓	0,00468	-1,19	0,30451
Cxcr4	Chemokin (C-X-C Motiv) Rezeptor 4	NM_009911	1,04	0,86710	-3,35 ↓	0,00715	3,50 ↑	0,00862
Itgb7	Integrin beta 7	NM_013566	-3,47 ↓	0,00002	-2,84 ↓	0,00000	-1,22	0,01711
Itgam	Integrin alpha M	NM_001082960	7,13 ↑	0,00554	-1,65	0,25152	11,75 ↑	0,00009
Itgb2	Integrin beta 2	NM_008404	2,59 ↑	0,02414	1,06	0,85556	2,45 ↑	0,00455
Gene die mit der Rekrutierung und Migration von Immunzellen assoziiert sind								
Cxcl10	Chemokin (C-X-C Motiv) Ligand 10	NM_021274	4,60 ↑	0,02998	4,59 ↑	0,02829	1,00	0,98671
Cxcl2	Chemokin (C-X-C Motiv) Ligand 2	NM_009140	5,44 ↑	0,00845	4,31 ↑	0,01224	1,26	0,23478
Ccl9	Chemokin (C-C Motiv) Ligand 9	NM_011338	6,34 ↑	0,00026	4,09 ↑	0,00136	1,55	0,01030
Ccl11	Chemokin (C-C Motiv) Ligand 1	NM_011329	6,28 ↑	0,00561	3,48 ↑	0,01481	1,81	0,01960
Vegfa	Vascular endothelial growth factor A	NM_001025250	3,14 ↑	0,00090	2,10 ↑	0,00714	1,50	0,03173

5 Diskussion

Diese Arbeit zeigt, dass Fibroblasten mittels SCF und weiterer membranständiger Mediatoren die Proliferation und Differenzierung von unreifen MZ induzieren und dass hierfür deren Integrin-vermittelte Adhäsion an Fibroblasten notwendig ist.

5.1 Die Cokultur mit Fibroblasten induziert eine verstärkte Proliferation und die Differenzierung von Mastzellen

Die Ergebnisse der hier vorliegenden Arbeit verdeutlichen, dass die durch Fb induzierte verstärkte Proliferation der IL-3-abhängigen BMCMC vom direkten Zellkontakt abhängig ist. In den ersten 7 Tagen der Kultur war die Anzahl der mit direktem Kontakt zu den Fb kultivierten CokuMZ deutlich höher, als die Anzahl der allein kultivierten BMCMC oder der ohne direkten Zellkontakt mit den Fb kultivierten InMZ. Die Ursache für den Proliferationsstopp der CokuMZ am Tag 7 könnte die sehr hohe Zellzahl im Kulturgefäß und die daraus resultierende Nährstoffknappheit sein, wodurch die Zellen, nach der Phase logarithmischen Wachstums, die sogenannte stationäre Phase erreichen. Das Wachstum der BMCMC und InMZ ist damit zwar insgesamt nach 11 Tagen Cokultur mit dem der CokuMZ vergleichbar, tritt jedoch mit der deutlichen Verzögerung auf.

Dabei wurde die starke Proliferation der MZ aller Ansätze möglicherweise durch das dem Kulturmedium beigesetzte IL-3 verursacht, das für das Überleben von BMCMC notwendig ist, aber auch deren Proliferation induziert [113–116]. Tatsächlich zeigten bereits Levi-Schaffer et al., dass BMCMC in der Cokultur mit 3T3 Fb in IL-3-haltigem WEHI-3 konditioniertem Medium sehr stark, ohne WEHI-3 konditioniertes Medium hingegen nicht proliferieren [153]. Andererseits wiesen Fujita et al. in einer Reihe von Arbeiten nach, dass der direkte Kontakt zu Fb unabhängig von IL-3 Überleben, Proliferation und Heparinsynthese von MZ induziert und dass diese Effekte sehr wahrscheinlich von Kit und SCF abhängig sind [148, 155, 156]. Sie zeigten, dass $WBB6F_1\text{-Kit}^{W/W^v}$ -BMCMC nach Kontakt mit Fb, im Gegensatz zu Wildtyp-BMCMC, nicht proliferieren und kein Heparin synthetisieren [148, 155]. Auch die Cokultur von BMCMC mit SCF-defizienten $WCB6F\text{-Sl/Sl}^d$ -Fb induziert die IL-3-unabhängige Proliferation und Heparinsynthese von BMCMC nicht, sondern hemmt sogar deren IL-3-induzierte Proliferation [156, 156]. Dabei ist anzumerken, dass es sich bei den von Fujita et al. verwendeten Fb nicht um Swiss albino 3T3 Fb handelte. Dass die Art der verwendeten Fb eine Rolle spielt,

geht aus einer Arbeit von Ebi et al. hervor. Deren Arbeit zeigte, dass die IL-3-unabhängige Fb-induzierte Proliferation von MZ durch den Kontakt mit Swiss Albino 3T3 Fb, wie sie auch in der hier vorliegenden Arbeit verwendet wurden, deutlich geringer ist, als die durch den Kontakt zu NIH/3T3 Fb induzierte Proliferation [177]. Gytoku et al. stellten interessanterweise fest, dass BMCMC zwar in den ersten zwei Tagen der Cokultur mit NIH/3T3 Fb ohne IL-3 leicht proliferieren, dass aber deren Anzahl nach insgesamt 6 Tagen Cokultur, im Vergleich zur Anzahl der ursprünglich eingesäten BMCMC, verringert ist [161]. Insgesamt zeigten die früheren Arbeiten, dass die durch 3T3 Fb induzierte, kontaktabhängige MZ-Proliferation ohne IL-3 im Kulturmedium um ein vielfaches geringer ist. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bestätigen jene frühere Arbeiten insofern, als dass gezeigt worden ist, dass die Steigerung der Proliferation von BMCMC durch Fb kontaktabhängig ist, wenn auch synergistische Effekte durch das im Medium enthaltene IL-3 die Proliferation der MZ insgesamt verstärken können.

Auch die Differenzierung der BMCMC zum CTMC-Phänotyp wird nur durch den direkten Zellkontakt zu den Fb induziert. Das zeigen der starke Anstieg des Histamingehaltes und die deutlich erhöhten Expressionslevel von *hdc* und *mcpt4* in den CokuMZ. Unreife IL-3-abhängige murine MZ enthalten, wie die in dieser Arbeit verwendeten BMCMC, nur geringe Mengen Histamin [60, 61]. Levi-Schaffer et al. wiesen bereits nach, dass die 14-tägige Cokultur von MZ und Fb zu einem starken Anstieg des Histamingehaltes der MZ führt [153]. In der hier vorliegenden Arbeit konnte nun gezeigt werden, dass diese Fb-induzierte Steigerung des Histamingehaltes von MZ kontaktabhängig ist. Dass der Histamingehalt von BMCMC und auch InMZ an Tag 7 und 11, im Vergleich zu Tag 3 der Kultur, leicht verringert ist, kann vermutlich auf die starke Proliferation zurückgeführt werden.

Da MZ das Histamin in ihren Granula in relativ großen Mengen speichern können [57, 138], kann man vom Histamingehalt keine direkten Rückschlüsse auf die gegenwärtige Produktion von Histamin ziehen. Daher wurde zusätzlich die Expression des Enzyms HDC, welches Histidin zu Histamin decarboxyliert, auf mRNA-Ebene untersucht. Mit den Daten zum Histamingehalt übereinstimmend, zeigten die Ergebnisse der RT-PCR und der RTq-PCR, dass *hdc* von den CokuMZ deutlich verstärkt exprimiert wird, von den InMZ hingegen nicht. Neben dem hohen Histamingehalt zählen die MZ-Proteasen MCPT-4 und -5 sowie die MC-CPA zu den wichtigsten Differenzierungsmarkern der murinen CTMC [63]. Die Ergebnisse der Expressionsanalyse für *mcpt4*, *mcpt5* und *mc-cpa* sind unterschiedlich. Während die Expression von *mcpt4* durch Fb kontaktabhängig äußerst stark induziert wurde, war die Expression von *mcpt5* und *mc-cpa* in den BMCMC bereits hoch und wurde durch die Cokultur mit Fb weder in InMZ noch in CokuMZ erhöht.

In vivo werden die MZ-Proteasen MCPT-5 und MC-CPA von MZ des CTMC-Phänotyps exprimiert, jedoch nicht von MMC, die durch die Expression von MCPT-1 und -2 charakterisiert sind [178–181]. Gurish et al. wiesen jedoch *in vitro* eine relativ starke Expression von *mcpt5* und *mc-cpa* in mittels rIL-3 generierten BMCMC nach [100]. McNeil et al. zeigten, dass die MCPT-5 bereits sehr früh während der *in vitro* Differenzierung von MZ aus Knochenmarkzellen exprimiert wird, obgleich die Expression deutlich geringer war, als in murinen peritonealen MZ [182]. Während die Expression der CTMC-spezifischen Proteasen MCPT-5 und MC-CPA in einer relativ frühen Phase in der Entwicklung von MZ durch IL-3 induziert wird, zeigt sich die Expression von MCPT-4 erst nach Induktion der terminalen Differenzierung zu CTMC durch SCF und gilt als später Differenzierungsmarker der CTMC [100, 183]. Daher wurden Analysen der Expression von *mcpt5* sowie *mc-cpa* von den weiteren Untersuchungen zur Fb-induzierten MZ-Differenzierung ausgeschlossen und der Fokus auf *hdc* und *mcpt4* gerichtet. Beide Gene wurden durch die Cokultur mit den Fb und nur nach dem direkten Zellkontakt sehr stark exprimiert. Dies zeigt, dass die terminale Differenzierung von BMCMC zu MZ des CTMC-Phänotyps, induziert durch die gemeinsame Kultur mit Fb, direkt vom Zellkontakt abhängig ist.

5.2 Mastzellen adhären durch VCAM-1/ $\alpha_4\beta_7$ -Interaktion an Fibroblasten

Wie die weiteren Untersuchungen zum Zellkontakt der BMCMC und Fb zeigten, findet eine feste Adhäsion der BMCMC an Fb statt. Diese wird durch VCAM-1 auf der Zelloberfläche von Fb und dessen Liganden $\alpha_4\beta_7$ auf MZ vermittelt.

Blockierungsversuche zeigten, dass von den untersuchten Adhäsionsmolekülen nur VCAM-1 an der Adhäsion der BMCMC an die Fb beteiligt war.

Die Zahl der adhärenen MZ war, im Vergleich zur unblockierten Kontrolle, jedoch nicht komplett sondern nur um 40 % reduziert. Dies deutet darauf hin, dass weitere nicht analysierte Adhäsionsmoleküle an der Bindung beteiligt sind. In einer früheren Arbeit von Dudeck et al. wurde nachgewiesen, dass BMCMC unter anderem über VCAM-1 fest an aktivierte Endothelzellen (EZ) adhären [74]. Dabei wurde die Adhäsion der BMCMC an die EZ durch die selbe Blockierung von VCAM-1 im gleichen Ausmaß gehemmt, wie die hier untersuchte Adhäsion der BMCMC an die Fb. Ebenfalls gleich war die Beobachtung, dass die Blockierung von JAM-3 und E-Cadherin die Adhäsion der BMCMC nicht beeinflusst. Eine Beteiligung von ICAM-2 an der Adhäsion der BMCMC an die EZ, wie sie von Dudeck et al. gezeigt wurde, konnte bei der Bindung an die Fb nicht festgestellt werden. Das sehr stark von den Fb exprimierte Adhäsionsmolekül Thy-1

ist bislang nur wenig charakterisiert (Übersicht [184]). Saalbach et al. konnten nachweisen, dass das Integrin $\alpha_V\beta_3$ im humanen System ein Ligand für Thy-1 ist [185]. Die hier vorliegenden Ergebnisse zeigen jedoch, dass Thy-1 an der Adhäsion von murinen BMCMC an Fb, trotz der Expression von $\alpha_V\beta_3$ auf den BMCMC, nicht beteiligt ist.

Die durchflusszytometrische Analyse zeigte die Expression der VCAM-1-Liganden $\alpha_4\beta_1$ -Integrin und $\alpha_4\beta_7$ -Integrin durch die BMCMC. Doch nur die Blockierung von α_4 und β_7 verminderte die Anzahl von adhären BMCMC. Das weist auf die Beteiligung von $\alpha_4\beta_7$ -Integrin an der Adhäsion von BMCMC an Fb über VCAM-1 hin.

Es ist bekannt, dass das $\alpha_4\beta_7$ -Integrin und dessen Liganden MadCAM-1 und VCAM-1, sowohl für die gewebsspezifische konstitutionelle Homöostase von MCP im Interstitium als auch für die Rekrutierung von MCP zur Ausbildung einer intestinalen Mastozytose im Rahmen einer Helminthen-Infektion essentiell sind [65–67]. Des Weiteren konnte in früheren Arbeiten gezeigt werden, dass $\alpha_4\beta_7$ und VCAM-1, aber auch $\alpha_4\beta_1$, an der Migration von MCP in die entzündete Lunge beteiligt sind [75, 76]. Die Anzahl der MCP ist in der Milz, der Lunge und dem Knochenmark β_7 -defizienter Mäuse, im Vergleich zum Wildtyp unverändert [66]. Ob $\alpha_4\beta_7$ und VCAM-1 an der Homöostase der MCP bzw. der MZ in der Haut beteiligt sind, wurde jedoch bislang nicht untersucht. Dass die BMCMC, als Model unreifer MZ, durch die Interaktion der beiden Adhäsionsmoleküle eine feste Bindung mit den Fb eingehen, kann ein Hinweis darauf sein, dass sie bei der Migration von MCP in die Dermis eine Bedeutung haben. Wenn MCP das dermale Bindegewebe besiedeln, gelangen sie in engen Kontakt mit dermalen Fb, die im Wesentlichen das Bindegewebe ausmachen [98]. Da die MCP erst nach der Ankunft in der Dermis lokal differenzieren und schließlich zu MZ des CTMC-Typs ausreifen, ist ein Einfluss der Bindung an die Fb auf die MZ sehr wahrscheinlich [40, 41].

5.3 Mastzellen zeigen Proliferation aber nicht Differenzierung nach Adhäsion an immobilisiertes VCAM-1

Die 11-tägige Kultur von BMCMC auf immobilisiertem VCAM-1 zeigte, dass die Bindung der MZ an VCAM-1 allein die Differenzierung zu CTMC nicht auslöst: Die Expressionsniveaus von *hdc* und *mcpt4* sowie der Histamingehalt von den mit VCAM-1 kultivierten BMCMC waren im Vergleich zu den Kontrollen nicht erhöht. Allerdings wurde durch das VCAM-1 eine Verstärkung der Proliferation der BMCMC ausgelöst, die jedoch deutlich geringer war, als die Fb-induzierte.

Interessanterweise wiesen zwei Arbeitsgruppen nach, dass SCF zu einer verstärkten Integrin-vermittelten Adhäsion von hematopoetischen Zellen an Fibronektin bzw. mit VCAM-1 transfizierten Zellen führt [186, 187]. Dabei kam es durch *inside-out signaling* zu einer Aktivierung der Integrine $\alpha_4\beta_1$ oder $\alpha_5\beta_1$ und nicht etwa zu einer Erhöhung ihrer Expression [187]. Später konnte gezeigt werden, dass SCF auch die Adhäsion von MZ an Fibronektin verstärkt, wobei dies ebenfalls durch die Integrine $\alpha_4\beta_1$ oder $\alpha_5\beta_1$ vermittelt wird [97, 98]. Tan et al. bewiesen bei der Migration von MZ ein Zusammenspiel von SCF-Rezeptor Kit und α_4 -Integrinen, das vermutlich auf einer Konvergenz der durch die Bindung der jeweiligen Liganden ausgelösten Signalwege basiert [188]. Tatsächlich zeigt die vorliegende Arbeit, dass die Proliferation der BMCMC durch die gleichzeitige Stimulation mit VCAM-1 und SCF, im Vergleich zu der, die SCF oder VCAM-1 jeweils allein auslösen, deutlich erhöht ist. Inwieweit das auf eine Aktivierung der Integrine $\alpha_4\beta_1$ und $\alpha_5\beta_1$ zurückzuführen ist, wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht genauer untersucht, da die durch SCF und VCAM-1 ausgelöste Verstärkung der Proliferation um ein Vielfaches geringer war als die Fb-induzierte. In Bezug auf die Differenzierung hatte die Stimulation mit SCF interessanterweise keine Auswirkungen. Sowohl der Histamingehalt als auch die Expression von *hdc* und *mcpt4* blieben im Vergleich zu den Kontrollen unverändert.

Da die Bindung von MZ an Fb über VCAM-1 und $\alpha_4\beta_7$ -Integrin selbst die Differenzierung nicht auslöste, wurde die Hypothese aufgestellt, dass diese in erster Linie den Kontakt zum eigentlichen Mediator auf den Fb herstellt. Dabei kommt membranständiges SCF als möglicher Kandidat in Frage, obwohl rekombinantes SCF allein oder auch in Kombination mit VCAM-1 die Differenzierung und die sehr starke Proliferation der BMCMC nicht auslöste. Denn im Vergleich zu löslichem SCF, löst das membranständige eine nachhaltigere Aktivierung von Kit aus [107].

5.4 Von Swiss Albino 3T3 Fibroblasten exprimiertes SCF²⁴⁸ verbleibt in der membranständigen Form

Es existieren zwei Splicevarianten von SCF, die sich bezüglich des Exons 6, welches proteolytische Schnittstellen codiert, unterscheiden. SCF²⁴⁸ setzt durch proteolytische Spaltung lösliches SCF frei. SCF²²⁰, das Exon 6 nicht enthält, verbleibt meist in der membranständigen Form [105]. Dass Fb SCF exprimieren, konnte bereits hinreichend demonstriert werden. Allerdings gibt es in der Literatur keinen Hinweis darüber, welche der Splicevarianten durch die Swiss albino 3T3 Fb-Zelllinie exprimiert werden.

Mittels RT-PCR erfolgte, im Rahmen der vorliegenden Arbeit, der Nachweis der Expression von SCF²⁴⁸ auf den verwendeten *Swiss albino 3T3* Fb. Die Expression von SCF²²⁰ hingegen

wurde ausgeschlossen. In den Zellkulturüberständen der Cokultur wurde jedoch kein lösliches SCF detektiert. Lediglich die Überstände von Insert-Cokultur und Fb enthielten Spuren von SCF. Der Westernblot zeigte eindeutig die Expression von SCF durch die untersuchten Fb, da sowohl in den Totallysaten als auch in den Membranfraktionen spezifische Produktbanden nachgewiesen werden konnten. SCF ist ein sehr stark und auch sehr heterogen glykolysiertes Protein, das Homodimere ausbilden kann [79, 82, 106, 189, 190]. Somit handelt es sich bei den nachgewiesenen Produkten sehr wahrscheinlich um die monomeren und die dimeren Formen von membranständigem SCF im glykolysierten Status. Zusammengefasst weisen diese Ergebnisse darauf hin, dass die 3T3 Fb SCF²⁴⁸ auf der Zelloberfläche exprimieren, welches jedoch kaum durch proteolytische Spaltung in das Kulturmedium abgegeben wird.

5.5 Der SCF-Rezeptor Kit ist ein entscheidender aber nicht ausschließlicher Mediator der Fb-induzierten Effekte auf MZ

Rekombinantes SCF, welches der löslichen Form entspricht, führt durchaus zur Expression von MCPT-4 sowie zur Verstärkung der Produktion von Histamin und Heparin von BMCMC und induziert somit die Differenzierung zu CTMC in vergleichbarem Maß wie Fb [100, 101]. Allerdings waren die in den damaligen Experimenten verwendeten SCF-Konzentrationen, mit 50 ng/ml bzw. 200 ng/ml, um ein vielfaches höher, als die hier in der Kultur verwendeten. Dass SCF in der Cokultur membranständig verbleibt, kann demnach eine Ursache für die Kontaktabhängigkeit der Fb-induzierten Effekte auf BMCMC sein. Daher wurde als nächstes überprüft, inwieweit der MZ-Wachstumsfaktor SCF in der membranständigen Form für die Fb-induzierten Veränderungen der BMCMC ursächlich ist. Dazu wurden BMCMC aus dem Knochenmark von C57BL/6-*Kit*^{W-sh/W-sh}-Mäusen generiert und in gleicher Weise wie die Wt-BMCMC mit Fb kokultiviert. Die C57BL/6-*Kit*^{W-sh/W-sh}-Mäuse tragen eine Inversionsmutation im regulatorischen Bereich des *kit* Gens, die dazu führt, dass Kit in MZ und Melanozyten nicht exprimiert wird [144–146]. Zusammengefasst verdeutlichen die Ergebnisse, dass auch in den Kit-defizienten *Kit*^{W-sh/W-sh}-MZ die kontaktabhängige Fb-induzierte Proliferation und Differenzierung in Richtung CTMC ausgelöst wurden, wenn auch in deutlich geringerem Ausmaß. Damit wurde die Relevanz von Kit bestätigt, die bereits von Fujita et al. durch Cokultur-Versuche mit ebenfalls Kit-defizienten WBB6F₁-*Kit*^{W/W-v}-BMCMC gezeigt wurde [148, 155]. Im Gegensatz zu Wt-BMCMC proliferierten *Kit*^{W/W-v}-BMCMC nicht und synthetisierten kein Heparin nach Kontakt zu Fb. Auch die Cokulturen von BMCMC mit WCB6F-SI/SI^d-Fb, die den Kit Liganden SCF nicht membranständig exprimieren, induzierte die Proliferation und Heparinsynthese von

BMCMC nicht [156, 157]. Dabei ist anzumerken, dass Fujita et al. den Einfluss der Fb auf die MZ ohne IL-3 untersuchten. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte nun erstmals demonstriert werden, dass es unter Zugabe von IL-3 auch unabhängig von Kit zur kontaktabhängigen Fb-induzierten Proliferation und zur Differenzierung von BMCMC zu CTMC kommt.

Auch *in vivo* ist SCF ein wichtiger MZ-Wachstumsfaktor. Eine Arbeit von Hayashi et al. verdeutlichte die essentielle Bedeutung von SCF bei der Einwanderung von MCP in die Haut [169]. Dabei betrug die Anzahl von MCP in der Haut von WBB6F₁-*Sl/Sl^d*-Embryonen, verglichen mit dem Wt, weniger als 1 %, während die Migration der Vorläufer bis in den Blutkreislauf nicht beeinträchtigt war. Auch die Ergebnisse der hier vorliegenden Arbeit zeigen, dass SCF/Kit-Wechselwirkungen die Phase der primären Besiedelung der Haut durch MZ beeinflussen. Die Anzahl dermalen MZ in der Rückenhaut von *Kit^{W-sh/W-sh}*-Mausfeten betrug am Tag 16 der Embryonalentwicklung nur 15 % der Anzahl von MZ in der Rückenhaut von Wt-Feten, wobei am Tag E14 noch keine MZ nachweisbar waren. Dabei kann keine Aussage darüber getroffen werden, ob die verringerte Anzahl von dermalen MZ auf Störungen bei der Einwanderung von Vorläufern, der lokalen Proliferation oder dem Überleben der Vorläufer bzw. der MZ zurückzuführen ist. Die Einwanderung der C57BL/6-*Kit^{W-sh/W-sh}*-MCP in die Dermis sollte aber ungestört stattfinden, denn im Unterschied zu ausgereiften MZ von C57BL/6-*Kit^{W-sh/W-sh}*-Mäusen, exprimieren die MCP den SCF-Rezeptor Kit trotz der Mutation [144–146].

In Übereinstimmung mit den vorliegenden Daten, wiesen auch Yamazaki et al. in der Haut von C57BL/6-*Kit^{W-sh/W-sh}*-Embryonen, am Tag 18 der Embryonalentwicklung reife MZ nach, wobei deren Anzahl im Vergleich zum Wt 40 % betrug und damit ebenfalls deutlich reduziert war [191]. Zusammengefasst zeigte jene Arbeit, dass die Expression von Kit im Hautgewebe der *Kit^{W-sh/W-sh}*-Embryonen im Vergleich zum Wt stark verringert ist und nach der Geburt weiter dramatisch abnimmt, gefolgt von der ebenfalls schnellen Abnahme der dermalen MZ. Die Ergebnisse von Yamazaki et al. zeigen zudem, dass jeweils in der Haut der Embryonen an Tag 18 der Embryonalentwicklung, der neugeborenen Mäuse und auch der 5 Tage alten Mäuse deutlich mehr ausgereifte MZ, mit starker MC-CPA Expression, gezählt wurden, als Kit-exprimierende Zellen [191]. Dies kann darauf hindeuten, dass Kit für die Ausreifung an sich nicht essentiell ist. SCF und somit auch Kit sind für die Einwanderung der MCP in die Dermis und sehr wahrscheinlich auch für die Proliferation und das Überleben lokal entscheidend. Dass es trotz Kit-Defizienz der MZ dennoch zur finalen Ausreifung von CTMC in der Haut kommt, wenn auch in geringerer Anzahl, deutet auch *in vivo* auf die Relevanz weiterer Fb-assoziiierter Faktoren neben SCF für die Differenzierung und Reifung der Haut-MZ hin.

5.6 Das Adhäsionsverhalten von Kit-defizienten BMCMC ist mit dem von Wildtyp-BMCMC vergleichbar

Da gezeigt werden konnte, dass die Adhäsion der MZ an die Fb für die Fb-induzierte Proliferation und Differenzierung der MZ Voraussetzung ist, und dass beides in *Kit^{W-sh/W-sh}*-MZ deutlich verringert ist, wurde untersucht ob bei *Kit^{W-sh/W-sh}*-MZ ein verändertes Adhäsionsverhalten vorliegt. Bezüglich der Expression verschiedener Adhäsionsmoleküle auf *Kit^{W-sh/W-sh}*-MZ konnten keine Unterschiede zu Wt-MZ festgestellt werden. Die Blockierungsversuche zeigten, dass die Adhäsion der *Kit^{W-sh/W-sh}*-MZ ebenfalls durch VCAM-1 auf Fb und $\alpha_4\beta_7$ auf MZ vermittelt wird. Somit konnten keine Unterschiede im Adhäsionsverhalten aufgrund der Kit-Defizienz festgestellt werden. Dies steht im Widerspruch zu bisher veröffentlichten Daten, die auf eine Relevanz des SCF-Rezeptors Kit bei der Adhäsion von MZ an Fb hinwiesen. Kaneko et al. zeigten beispielsweise, dass Wt-BMCMC nicht an *Sl/Sl^d* 3T3 Fb adhären, die einen Defekt im *scf*-Gen tragen [192]. Des Weiteren war die Adhäsion von *Kit^{W/W-v}*- und *Kit^{W-sh/W-sh}*-BMCMC an Wt-Fb verringert, wobei *Kit^{W/W-v}*-MZ einen Defekt in der Tyrosinkinaseaktivität von Kit tragen und *Kit^{W-sh/W-sh}*-MZ defizient für Kit sind [142–144]. Adachi et al. demonstrierten später, anhand von Experimenten mit MZ mit verschiedenen Mutationen in *kit*, dass die extrazelluläre Domäne von Kit für die Bindung der MZ an Fb essentiell ist [99]. *Kit^{W/W}*-MZ, die aufgrund einer Deletion der Transmembrandomäne defizient für Kit sind [142], banden nicht an Fb. Hingegen entsprach die Bindung von *Kit^{W/W42}*-MZ, deren Oberflächenexpression von Kit bei fehlender Kinaseaktivität intakt ist [193], der von Wt-MZ. Jedoch handelte es sich bei den verwendeten MZ nicht um aus dem Knochenmark generierte BMCMC, sondern um MZ, die aus Milzzellen generiert wurden. Interessanterweise demonstrierten Serve et al. anhand einer aufwändigen Studie mit *Kit^{W-sh/W-sh}*-BMCMC, die mit normalen und verschiedenen mutierten Kit-Varianten rekonstituiert wurden, dass die Kinaseaktivität am Tyrosinrest 719 von Kit für die Adhäsion an Fibronektin notwendig ist [194]. Dabei erfolgt durch Tyrosin 719 die Aktivierung der Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) über das Signalprotein p85. Inwieweit die Kinaseaktivität auch bei der Adhäsion an Fb relevant ist, wurde nicht detailliert untersucht. Dastych et al. zeigten, dass jener Signalweg in *Kit^{W/W-v}*-MZ intakt ist, was logisch erklären könnte, dass *Kit^{W/W-v}*-MZ trotz der Mutation an Fb binden können [195]. Es erklärt jedoch nicht, warum im Rahmen der hier gezeigten Ergebnisse *Kit^{W-sh/W-sh}*-MZ an Fb binden, die aufgrund ihrer Kit-Defizienz den entsprechenden Signalweg nicht aufweisen. Einen wichtigen Hinweis gibt jedoch eine Arbeit von Tan et al., die zeigt, dass auch das α_4 -Integrin über das Signalprotein p85 an einen PI3K-Signalweg geknüpft ist, der an der Regulation der Migration von MZ beteiligt ist [188]. Wie in der vorliegenden Arbeit nachgewiesen, wird die Adhäsion von BMCMC an Swiss albino 3T3

Fb durch $\alpha_4\beta_7$ und VCAM-1 vermittelt wird. Eventuell gleicht die Aktivierung des $\alpha_4\beta_7$ -Integrins die fehlende Kit-Aktivität aus, wodurch trotz Kit-Defizienz keine Verminderung der Adhäsion von *Kit*^{W-sh/W-sh}-MZ an Fb erfolgt. Des Weiteren ist es denkbar, dass die unterschiedliche Dauer der Adhäsionsversuche und der jeweils analysierte Zeitpunkt die verschiedenen Ergebnisse bedingen. Während in der hier vorliegenden Arbeit die Zahl der gebundenen MZ bereits nach 30 min bestimmt wurde, zählten Kaneko et al., die in ihrer Arbeit eine im Vergleich zu Wt-MZ verringerte Adhäsion von *Kit*^{W-sh/W-sh}-MZ nachwiesen, die Anzahl der adhärenen MZ erst nach 3 Stunden [192]. Es könnte demnach sein, dass bei der in dieser Arbeit betrachteten initialen Phase der Adhäsion von BMCMC an Fb nicht Kit, sondern die nachgewiesene Integrin-vermittelte Bindung entscheidend ist. Inwieweit Kit zu einem späteren Zeitpunkt relevant ist, wurde nicht untersucht.

5.7 Die Fb-induzierte Proliferation und -Differenzierung der MZ wird durch membranassoziierte Faktoren ausgelöst

Da die Adhäsion an immobilisiertes VCAM-1 zwar die Proliferation von BMCMC nicht aber deren Differenzierung auslöste, wurde in einem besonderen Cokultur-Ansatz überprüft, ob der auslösende Faktor löslich oder membranständig ist. Obwohl die Differenzierung nur nach direktem Zellkontakt ausgelöst wird, wäre es möglich, dass der oder die auslösenden Mediatoren löslich sind und erst in Folge der Adhäsion freigesetzt werden. So zeigten beispielsweise Matsuda et al., dass Fb, die mit BMCMC und IL-3 kultiviert werden, den löslichen Wachstumsfaktor NGF freisetzen, der zur Differenzierung von BMCMC zu CTMC führt [133]. Da ein Einfluss eines solchen löslichen Faktors auf die Proliferation der BMCMC denkbar ist, wurde dies ebenfalls in die Untersuchung einbezogen.

BMCMC wurden in einem Transmembraneinsatz im Überstand einer Cokultur simultan mit interagierenden MZ und Fb kultiviert (spMZ), um den Einfluss von löslichen Mediatoren, die während der Cokultur freigesetzt werden, auf die MZ zu untersuchen. Dieses Verfahren wurde angewandt um sicher zu stellen, dass die Bedingungen, bezüglich der Zusammensetzung des Kulturüberstandes, für die spMZ genau denen der CokuMZ entsprechen. Dies wäre beispielsweise durch die Stimulation von BMCMC mit dem Überstand einer Cokultur nicht gewährleistet.

Wie die Zellzahlen am Tag 7 der Cokultur zeigten, proliferierten Wt- und auch *Kit*^{W-sh/W-sh}-spMZ nicht stärker als die Kontrollen. Dies beweist, dass der oder die unbekannten Faktoren, die unabhängig von Kit die gesteigerte Proliferation der MZ auslösen, membranständig von den Fb exprimiert werden. Dies gilt ebenso für die Induktion der Differenzierung der MZ, wie die quantitative Expressionsanalyse von *hdc* und *mcpt4* verdeutlicht. Die Expressionslevel beider Gene

von Wt- und *Kit^{W-sh/W-sh}*-spMZ unterschieden sich nicht von denen der jeweiligen InMZ und waren auch im Vergleich zu den Kontrollen nicht verändert. Somit kann beispielsweise NGF, obschon er *in vitro* die IL-3 abhängige Proliferation von BMCMC verstärkt und auch die Differenzierung zum CTMC-Phänotyp auslöst [133], als Kandidat für den gesuchten Faktor ausgeschlossen werden.

5.8 Genomweite Expressionsanalyse zur Fibroblasten-induzierten Mastzellen-Differenzierung

Die genomweite Expressionsanalyse zeigte umfassende Veränderungen im Expressionsprofil von MZ nach 11 Tagen Cokultur mit Fb. Die bereits per RT-PCR gezeigte Hochregulation von *hdc* und *mcpt4* wurde durch die Microarraydaten bestätigt. Neben diesen beiden Genen war die Expression weiterer Gene, deren Funktion mit dem Phänotyp und den Funktionen der CTMC assoziiert sind, ebenfalls kontaktabhängig hochreguliert. Dazu zählen zum Beispiel der hochaffine Endothelin-1 Rezeptor A (*etar-1*), die DOPA Decarboxylase (*ddc*) und der primäre Hyaluronanrezeptor CD44. Matsushima et al. zeigten, dass murine fötale Haut-MZ (*fetal skin mast cells*, FSMC) Etar-1 stark exprimieren, BMCMC hingegen nur sehr schwach [196]. Des Weiteren wurde gezeigt, dass es durch Stimulation mit Endothelin-1, dem Liganden von Etar-1 [197], zur Degranulation von FSMC, nicht aber von BMCMC, kommt [198]. Da FSMC ein *in vitro*-Modell für CTMC sind [199], deuten diese Ergebnisse an, dass die erhöhte Etar-1 Expression als Marker für CTMC betrachtet werden kann. Auch die erhöhte Expression der mRNA der DDC, die 5-Hydroxytryptophan zum biogenen Amin Serotonin decarboxyliert, ist mit dem Phänotyp CTMC assoziiert. Serotonin, das auch als 5-Hydroxytryptamine (5-HT) bezeichnet wird, wird von CTMC reichlich produziert. MMC enthalten, im Gegensatz dazu kein oder nur geringe Mengen 5-HT (Übersicht in [200]). CD44 ist der primäre Rezeptor für Hyaluronan, einer der Hauptbestandteile der extrazellulären Matrix in Bindegewebe [201]. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bestätigen eine kürzlich veröffentlichte Arbeit von Takano et al., die nachwies, dass die CD44 Expression von MZ nach der Cokultur mit Fb hochreguliert war und mit der terminalen Differenzierung von CTMC zusammenhängt [164].

Ebenfalls kontaktabhängig hochreguliert wurde die mRNA-Expression von *Vascular endothelial growth factor* (VEGF). VEGF ist von großer Bedeutung bei der Vaskulogenese, der Neuanlage des Endotheliums während der Embryonalentwicklung und bei der Angiogenese, dem Auswachsen von Gefäßen aus bereits bestehendem Endothelium, z.B. im Rahmen von Wachstums- und Wundheilungsprozessen (Übersicht in [202, 203]). VEGF zählt zu den Mediatoren, die in den Granula der MZ präformiert gespeichert und z.B. nach Aktivierung durch IgE und spezifisches

Antigen sofort freigesetzt werden [204]. Ob und inwieweit die VEGF Expression in den verschiedenen MZ Populationen unterschiedlich ist, ist bisher weitgehend unbekannt. Eine Arbeit von Fan et al. zeigte jedoch, dass sich die VEGF-Produktion im Verdauungstrakt der Ratte hauptsächlich auf die MZ des MMC-Phänotyps beschränkt. Die Autoren deuteten ihre Ergebnisse so, dass die VEGF-Produktion möglicherweise als ein Merkmal der MMC und nicht der CTMC betrachtet werden könne [205]. Andererseits ist bekannt, dass auch murine Haut-MZ, die zu CTMC zählen, VEGF produzieren und freisetzen können, was Teil ihrer Funktion im Immunsystems der Haut ist [6, 196]. Obwohl die erhöhte VEGF-Expression nicht eindeutig als Differenzierungsmarker für CTMC betrachtet werden kann, ergänzt sie das Bild von der Fb-induzierten Differenzierung und insbesondere der Ausreifung von BMCMC zu reifen CTMC.

Ebenso verhält es sich mit der kontaktabhängigen Hochregulation der Genexpression der Chemokine CCL1 (I-309), CCL9 (*macrophage inflammatory protein-1 γ* , MIP-1 γ), CXCL2 (MIP-2) und CXCL10 (*interferon gamma-induced protein 10 kDa*, IP-10). Es handelt sich zusammengefasst um Chemokine, die an der Rekrutierung von MZ und anderen Immunzellen wie Neutrophilen, Monozyten und dendritischen Zellen in entzündlich veränderte periphere Gewebe beteiligt sind [206–209]. Auch hierbei handelt es sich nicht um Marker für CTMC, aber um Mediatoren, die eine Relevanz für die Funktion reifer MZ in peripheren Geweben haben.

Die Hypothese der Kontaktabhängigkeit der FB-induzierten Differenzierung der unreifen MZ zu reifen MZ konnte auch durch die Herabregulation der Expression von Integrin β_7 und der Chemokinrezeptor CXCR2 sowie CX3CR1 in den CokuMZ bestätigt werden. Integrin β_7 und CXCR2 werden von MZ-Vorläufern exprimiert und sind zum Beispiel an ihrer Rekrutierung in die Schleimhaut des Dünndarms involviert [66, 67]. Inwieweit sie für die Rekrutierung von MZ-Vorläufern in die Dermis relevant sind, wurde bisher jedoch nicht untersucht. CX3CR1 ist der Rezeptor für Fractalkine, ein besonderes Chemokin, das als einziges auch membranständig exprimiert wird und als Adhäsionsmolekül fungieren kann [210, 211]. Murine BMCMC und humane Haut-MZ exprimieren CX3CR1 und zeigen Chemotaxis in Richtung Fractalkine, was auf eine mögliche Bedeutung des Rezeptors an der Einnistung von dermalen MZ hinweist [212]. CX3CR1-*knock out*-Mäuse zeigen nach Verbrennung eine verzögerte Wundheilung der Haut und verringerte Angiogenese, assoziiert mit einer reduzierten Einwanderung von myeloiden Zellen [213]. Da MZ von myeloiden Vorläuferzellen abstammen und von Bedeutung bei der Wundheilung der Haut sowie der Angiogenese sind [28, 31, 45], könnte CX3CR1 eventuell an der Migration von MZ-Vorläufern in die Dermis beteiligt sein. Eine kontaktabhängige Verringerung der CX3CR1-Expression auf BMCMC nach der Cokultur mit Fb kann somit mit der kontaktabhängigen Differenzierung zu reifen CTMC zusammenhängen.

Neben den durch die Adhäsion an die Fb regulierten Gene konnten auch Gene identifiziert werden, deren Expression durch die Cokultur ohne direkten Kontakt zu Fb verändert wurde. Darunter sind beispielsweise die Gene für den Chemokinrezeptor CXCR4 sowie für die Integrine α_M (*itgam*) und β_2 (*itgb2*).

CXCR4 ist der Rezeptor für das Chemokin CXCL12 [214, 215], auch *stromal cell derived factor-1 α* (SDF-1 α) genannt, das in der Haut konstitutiv vom Endothel exprimiert wird [216]. Die CXCL12/CXCR4-Interaktion spielt in der Homöostase bzw. Rekrutierung verschiedener normaler und maligner Stamm- und Vorläuferzellen eine Rolle und ist ein wichtiges Ziel in der Krebsforschung (Übersicht in [217]). Auch auf MZ wirkt CXCL12 über CXCR4 chemotaktisch [218]. Sowohl humane als auch murine MZ exprimieren CXCR4 [219, 220]. Die hier vorliegenden Ergebnisse zeigen interessanterweise, dass die mRNA Expression von CXCR4, verglichen mit den BMCMC, in den InMC erhöht war, in den CokuMZ hingegen nicht. Das deutet darauf hin, dass Fb einen löslichen Mediator freisetzen, der die CXCR4 Expression der MZ erhöht, um evtl. Chemotaxis auszulösen. Bei Adhäsion der MZ an Fb scheint eine Verstärkung der Expression nicht stattzufinden oder wird wieder verringert. Dies wurde jedoch nicht näher untersucht. Wie im Allgemeinen die Expression von CXCR4 in MZ reguliert ist, wurde bisher kaum untersucht. Die Arbeit von Matsuura et al. zeigte aber, dass murine BMCMC CXCR4 exprimieren, und dass ein löslicher Faktor im Serum die Expression erhöht. Die Inkubation der BMCMC mit SCF hingegen inhibierte diese Steigerung der mRNA-Expression von CXCR4, nicht aber die basale Expression des Rezeptors [220]. Die Schlussfolgerung der Autoren, dass die CXCR4-Expression in unreifen MZ im Zusammenhang mit der Einwanderung möglicherweise erhöht ist und sehr wahrscheinlich bei der Reifung im Gewebe herunterreguliert wird, steht im Einklang mit den Ergebnissen der hier vorliegenden Arbeit.

Die Expressionsniveaus von *itgam* und *itgb2*, den Transkripten der Integrine α_M und β_2 , waren in InMZ und in CokuMZ gleichermaßen erhöht. Rosenkranz et al. zeigten, dass die Anzahl der MZ im Peritoneum und der Rückenhaut, beides Gewebe, die MZ des CTMC Typs enthalten, in $\alpha_M\beta_2$ -defizienten Mäusen verringert ist [68]. Dies deutet zusammengekommen darauf hin, dass das Integrin $\alpha_M\beta_2$ an der Homöostase von CTMC beteiligt sein könnte.

5.9 Schlussfolgerungen

Die Ergebnisse dieser Arbeit erweitern die bisherigen Erkenntnisse über den Einfluss von Fb auf die Biologie der MZ. Die Daten der genomweiten Expressionsanalyse verdeutlichen die umfassende Differenzierung der MZ nach Kontakt mit Fb. Es konnte gezeigt werden, dass Fb

unreife BMCMC so beeinflussen, dass sie zu reifen CTMC differenzieren und dass dies von der Adhäsion der MZ an Fb abhängig ist. Durch die Cokultivierung der Zellen und die Untersuchung der Adhäsion, konnte insbesondere der Mechanismus der MZ/Fb Interaktion genauer charakterisiert werden. Einerseits konnten bisherige Arbeiten bestätigt werden, die zeigten, dass der durch die Fb exprimierte MZ Wachstumsfaktor SCF hierbei eine sehr wichtige Rolle einnimmt. Andererseits weisen die Ergebnisse deutlich auf die Relevanz von SCF/Kit-unabhängigen Mechanismen bei der Regulation der Fb-induzierten MZ-Differenzierung und -Proliferation hin. Auf diese Erkenntnisse können weiterführende Untersuchungen aufbauen, um diesen neuen Mechanismus zu identifizieren, der möglicherweise als therapeutisches Ziel verwendet werden könnte, um den Phänotyp bzw. die Anzahl von MZ in peripheren Geweben zu modulieren. Dies ist von Interesse, da MZ wichtige Effektorzellen des adaptiven und des angeborenen Immunsystems sind und daher im Rahmen zahlreicher Erkrankungen von Bedeutung sind, deren Verläufe sie positiv bzw. negativ beeinflussen können.

Literaturverzeichnis

- [1] Ehrlich P.: Beiträge zur Kenntniss der Anilinfärbungen und ihrer Verwendung in der mikroskopischen Technik. *Archiv für Mikroskopische Anatomie*, 1877;13(1):263–277.
- [2] Ehrlich P.: Beiträge zur Theorie und Praxis der histologischen Färbung. *Thesis*, 1878;pages 6–17.
- [3] Ehrlich P.: Beiträge zur Kenntnis der granulierten Bindegewebszellen und der eosinophilen Leukozyten. 1879;.
- [4] Weber S., Krüger-Krasagakes S., Grabbe J., Zuberbier T. & Czarnetzki B.M.: Mast cells. *Int J Dermatol*, Jan 1995;34(1):1–10.
- [5] Galli S.J.: New insights into "the riddle of the mast cells": microenvironmental regulation of mast cell development and phenotypic heterogeneity. *Lab Invest*, Jan 1990;62(1):5–33.
- [6] Metz M., Siebenhaar F. & Maurer M.: Mast cell functions in the innate skin immune system. *Immunobiology*, Jan 2008;213(3-4):251–60.
- [7] Kalesnikoff J. & Galli S.J.: New developments in mast cell biology. *Nat Immunol*, Nov 2008; 9(11):1215–23.
- [8] Weller C.L., Collington S.J., Williams T. & Lamb J.R.: Mast cells in health and disease. *Clin Sci*, Jun 2011;120(11):473–84.
- [9] Bach M.K. & Brashler J.R.: On the nature of the presumed receptor for IgE on mast cells. II. Demonstration of the specific binding of IgE to cell-free particulate preparations from rat peritoneal mast cells. *J Immunol*, Aug 1973;111(2):324–30.
- [10] Gurish M.F., Ghildyal N., Arm J., Austen K.F., Avraham S., Reynolds D. & Stevens R.L.: Cytokine mRNA are preferentially increased relative to secretory granule protein mRNA in mouse bone marrow-derived mast cells that have undergone IgE-mediated activation and degranulation. *J Immunol*, Mar 1991;146(5):1527–33.
- [11] Galli S.J., Wershil B.K., Gordon J.R. & Martin T.R.: Mast cells: immunologically specific effectors and potential sources of multiple cytokines during IgE-dependent responses. *Ciba Found Symp*, Jan 1989;147:53–65; discussion 65–73.
- [12] Supajatura V., Ushio H., Nakao A., Akira S., Okumura K., Ra C. & Ogawa H.: Differential responses of mast cell Toll-like receptors 2 and 4 in allergy and innate immunity. *J Clin Invest*, May 2002;109(10):1351–9.
- [13] Orinska Z., Bulanova E., Budagian V., Metz M., Maurer M. & Bulfone-Paus S.: TLR3-induced activation of mast cells modulates CD8+ T-cell recruitment. *Blood*, Aug 2005;106(3):978–87.
- [14] Malaviya R., Gao Z., Thankavel K., van der Merwe P.A. & Abraham S.N.: The mast cell tumor necrosis factor alpha response to FimH-expressing Escherichia coli is mediated by the glycosylphosphatidylinositol-anchored molecule CD48. *Proc Natl Acad Sci USA*, Jul 1999; 96(14):8110–5.

- [15] Malaviya R., Ikeda T., Ross E. & Abraham S.N.: Mast cell modulation of neutrophil influx and bacterial clearance at sites of infection through TNF- α . *Nature*, May 1996; 381(6577):77–80.
- [16] el Lati S.G., Dahinden C.A. & Church M.K.: Complement peptides C3a- and C5a-induced mediator release from dissociated human skin mast cells. *The Journal of investigative dermatology*, May 1994;102(5):803–6.
- [17] Echtenacher B., Männel D.N. & Hültner L.: Critical protective role of mast cells in a model of acute septic peritonitis. *Nature*, May 1996;381(6577):75–7.
- [18] Prodeus A.P., Zhou X., Maurer M., Galli S.J. & Carroll M.C.: Impaired mast cell-dependent natural immunity in complement C3-deficient mice. *Nature*, Nov 1997;390(6656):172–5. TY - JOUR 10.1038/36586.
- [19] Marshall J.S.: Mast-cell responses to pathogens. *Nat Rev Immunol*, Oct 2004;4(10):787–99. TY - JOUR 10.1038/nri1460.
- [20] Nawa Y., Kiyota M., Korenaga M. & Kotani M.: Defective protective capacity of W/W^v mice against *Strongyloides ratti* infection and its reconstitution with bone marrow cells. *Parasite Immunol*, Jul 1985;7(4):429–38.
- [21] Khan A.I., Horii Y., Tiuria R., Sato Y. & Nawa Y.: Mucosal mast cells and the expulsive mechanisms of mice against *Strongyloides venezuelensis*. *Int J Parasitol*, Aug 1993; 23(5):551–5.
- [22] Watanabe N., Nawa Y., Okamoto K. & Kobayashi A.: Expulsion of *Hymenolepis nana* from mice with congenital deficiencies of IgE production or of mast cell development. *Parasite Immunol*, Mar 1994;16(3):137–44.
- [23] Katz H.R., Arm J.P., Benson A.C. & Austen K.F.: Maturation-related changes in the expression of Fc gamma RII and Fc gamma RIII on mouse mast cells derived in vitro and in vivo. *J Immunol*, Nov 1990;145(10):3412–7.
- [24] Woolhiser M. & Okayama Y.: IgG-dependent activation of human mast cells following up-regulation of Fc γ by IFN- γ . *European Journal*, Jan 2001;.
- [25] Daëron M., Prouvost-Danon A. & Voisin G.A.: Mast cell membrane antigens and Fc receptors in anaphylaxis. II. Functionally distinct receptors for IgG and for IgE on mouse mast cells. *Cell Immunol*, Jan 1980;49(1):178–89.
- [26] Genovese A., Bouvet J.P., Florio G., Lamparter-Schummert B., Björck L. & Marone G.: Bacterial immunoglobulin superantigen proteins A and L activate human heart mast cells by interacting with immunoglobulin E. *Infect Immun*, Oct 2000;68(10):5517–24.
- [27] Maurer M., Fischer E., Handjiski B., von Stebut E., Algermissen B., Bavandi A. & Paus R.: Activated skin mast cells are involved in murine hair follicle regression (catagen). *Lab Invest*, Oct 1997;77(4):319–32.
- [28] Weller K., Foitzik K., Paus R., Syska W. & Maurer M.: Mast cells are required for normal healing of skin wounds in mice. *FASEB J*, Nov 2006;20(13):2366–8.
- [29] Silberstein R., Melnick M., Greenberg G. & Minkin C.: Bone remodeling in W/W^v mast cell deficient mice. *Bone*, Jan 1991;12(4):227–36.

-
- [30] Meininger C.J., Yano H., Rottapel R., Bernstein A., Zsebo K.M. & Zetter B.R.: The c-kit receptor ligand functions as a mast cell chemoattractant. *Blood*, Feb 1992;79(4):958–63.
- [31] Hiromatsu Y. & Toda S.: Mast cells and angiogenesis. *Microsc Res Tech*, Jan 2003; 60(1):64–9.
- [32] Rothe M.J. & Kerdel F.A.: The mast cell in fibrosis. *Int J Dermatol*, Jan 1991;30(1):13–6.
- [33] Gotis-Graham I. & McNeil H.P.: Mast cell responses in rheumatoid synovium. Association of the MCTC subset with matrix turnover and clinical progression. *Arthritis Rheum*, Mar 1997;40(3):479–89.
- [34] Eklund K.K.: Mast cells in the pathogenesis of rheumatic diseases and as potential targets for anti-rheumatic therapy. *Immunol Rev*, Jun 2007;217:38–52.
- [35] Brightling C.E., Bradding P., Symon F.A., Holgate S.T., Wardlaw A.J. & Pavord I.D.: Mast-cell infiltration of airway smooth muscle in asthma. *N Engl J Med*, May 2002; 346(22):1699–705.
- [36] Carroll N.G., Mutavdzic S. & James A.L.: Distribution and degranulation of airway mast cells in normal and asthmatic subjects. *Eur Respir J*, May 2002;19(5):879–85.
- [37] Nechushtan H.: The complexity of the complicity of mast cells in cancer. *Int J Biochem Cell Biol*, May 2010;42(5):551–4.
- [38] Grimbaldston M.A., Nakae S., Kalesnikoff J., Tsai M. & Galli S.J.: Mast cell-derived interleukin 10 limits skin pathology in contact dermatitis and chronic irradiation with ultraviolet B. *Nat Immunol*, Oct 2007;8(10):1095–104.
- [39] Metz M., Botchkarev V.A., Botchkareva N.V., Welker P., Tobin D.J., Knop J., Maurer M. & Paus R.: Neurotrophin-3 regulates mast cell functions in neonatal mouse skin. *Exp Dermatol*, May 2004;13(5):273–81.
- [40] Kitamura Y., SHIMADA M., Hatanaka K. & MIYANO Y.: Development of mast cells from grafted bone marrow cells in irradiated mice. *Nature*, Aug 1977;268(5619):442–3. TY - JOUR 10.1038/268442a0.
- [41] Kitamura Y., Go S. & Hatanaka K.: Decrease of mast cells in W/W^v mice and their increase by bone marrow transplantation. *Blood*, Aug 1978;52(2):447–52.
- [42] Sonoda T., Ohno T. & Kitamura Y.: Concentration of mast-cell progenitors in bone marrow, spleen, and blood of mice determined by limiting dilution analysis. *J. Cell. Physiol.*, Jul 1982;112(1):136–40.
- [43] Rodewald H.R., Dessing M., Dvorak A.M. & Galli S.J.: Identification of a committed precursor for the mast cell lineage. *Science*, Feb 1996;271(5250):818–22.
- [44] Jamur M.C., Grodzki A.C.G., Berenstein E.H., Hamawy M.M., Siraganian R.P. & Oliver C.: Identification and characterization of undifferentiated mast cells in mouse bone marrow. *Blood*, Jun 2005;105(11):4282–9.
- [45] Chen C.C., Grimbaldston M.A., Tsai M., Weissman I.L. & Galli S.J.: Identification of mast cell progenitors in adult mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Aug 2005;102(32):11408–13.
- [46] Franco C.B., Chen C.C., Drukker M., Weissman I.L. & Galli S.J.: Distinguishing mast cell and granulocyte differentiation at the single-cell level. *Cell Stem Cell*, Apr 2010;6(4):361–8.

-
- [47] Hardy W.B. & Wesbrook F.F.: The Wandering Cells of the Alimentary Canal. *The Journal of Physiology*, Nov 1895;18(5-6):490–i3.
- [48] Enerbäck L.: Mast cells in rat gastrointestinal mucosa. I. Effect of fixation. *Acta Pathol. Microbiol. Scand.*, 1966;66:289 – 302.
- [49] Enerbäck L.: Mast cells in rat gastrointestinal mucosa. 2. Dye-binding and metachromatic properties. *Acta Pathol Microbiol Scand*, Jan 1966;66(3):303–12.
- [50] Kitamura Y., Kanakura Y., Sonoda S., Asai H. & Nakano T.: Mutual phenotypic changes between connective tissue type and mucosal mast cells. *International Archives of Allergy and applied immunology*, Jan 1987;82(3-4):244–8.
- [51] Kanakura Y., Thompson H., Nakano T., Yamamura T., Asai H., KITAMURA Y., Metcalfe D.D. & Galli S.J.: Multiple bidirectional alterations of phenotype and changes in proliferative potential during the in vitro and in vivo passage of clonal mast cell populations derived from mouse peritoneal mast cells. *Blood*, Sep 1988;72(3):877–85.
- [52] Irani A.M. & Schwartz L.B.: Human mast cell heterogeneity. Jan 1994;15(6):303–8.
- [53] Gibson S. & Miller H.R.: Mast cell subsets in the rat distinguished immunohistochemically by their content of serine proteinases. *Immunology*, May 1986;58(1):101–4.
- [54] Enerbäck L.: Mucosal mast cells in the rat and in man. *Int Arch Allergy Appl Immunol*, Jan 1987;82(3-4):249–55.
- [55] WALKER B.E.: Mast cell turn-over in adult mice. *Nature*, Dec 1961;192:980–1.
- [56] Ruitenberg E.J. & Elgersma A.: Absence of intestinal mast cell response in congenitally athymic mice during *Trichinella spiralis* infection. *Nature*, Nov 1976;264(5583):258–60.
- [57] Keller R., Hess M.W. & RILEY J.F.: Mast cells in the skin of normal, hairless and athymic mice. *Experientia*, Feb 1976;32(2):171–2.
- [58] Kitamura Y., Kasugai T., Arizono N. & Matsuda H.: Development of mast cells and basophils: processes and regulation mechanisms. *Am J Med Sci*, Sep 1993;306(3):185–91.
- [59] Enerbäck L.: Berberine sulphate binding to mast cell polyanions: a cytofluorometric method for the quantitation of heparin. *Histochemistry*, Jan 1974;42(4):301–13.
- [60] Katz H.R., Stevens R.L. & Austen K.F.: Heterogeneity of mammalian mast cells differentiated in vivo and in vitro. *J Allergy Clin Immunol*, Aug 1985;76(2 Pt 2):250–9.
- [61] Rothenberg M.E. & Austen K.F.: Influence of the fibroblast environment on the structure of mast cell proteoglycans. *Ann N Y Acad Sci*, Jan 1989;556:233–44.
- [62] Swieter M., Mergenhagen S.E. & Siraganian R.P.: Microenvironmental factors that influence mast cell phenotype and function. *Proc Soc Exp Biol Med*, Jan 1992;199(1):22–33.
- [63] Pejler G., Abrink M., Ringvall M. & Wernersson S.: Mast cell proteases. *Advances in immunology*, Jan 2007;95:167–255.
- [64] Kitamura Y.: Heterogeneity of mast cells and phenotypic change between subpopulations. *Annual Review of Immunology*, Jan 1989;7:59–76.
- [65] Crapper R.M. & Schrader J.W.: Frequency of mast cell precursors in normal tissues determined by an in vitro assay: antigen induces parallel increases in the frequency of P cell precursors and mast cells. *J Immunol*, Aug 1983;131(2):923–8.

- [66] Gurish M.F., Tao H., Abonia J.P., Arya A., Friend D.S., Parker C.M. & Austen K.F.: Intestinal mast cell progenitors require CD49 β 7 (alpha4beta7 integrin) for tissue-specific homing. *J Exp Med*, Nov 2001;194(9):1243–52.
- [67] Abonia J.P., Austen K.F., Rollins B.J., Joshi S.K., Flavell R.A., Kuziel W.A., Koni P.A. & Gurish M.F.: Constitutive homing of mast cell progenitors to the intestine depends on autologous expression of the chemokine receptor CXCR2. *Blood*, Jun 2005; 105(11):4308–13.
- [68] Rosenkranz A.R., Coxon A., Maurer M., Gurish M.F., Austen K.F., Friend D.S., Galli S.J. & Mayadas T.N.: Impaired mast cell development and innate immunity in Mac-1 (CD11b/CD18, CR3)-deficient mice. *J Immunol*, Dec 1998;161(12):6463–7.
- [69] Gottfried O.N., Viskochil D.H., Fults D.W. & Couldwell W.T.: Molecular, genetic, and cellular pathogenesis of neurofibromas and surgical implications. *Neurosurgery*, Jan 2006; 58(1):1–16; discussion 1–16.
- [70] Ch'ng S., Wallis R.A., Yuan L., Davis P.F. & Tan S.T.: Mast cells and cutaneous malignancies. *Mod Pathol*, Jan 2006;19(1):149–59.
- [71] Diaconu N.C., Kaminska R., Naukkarinen A., Harvima R.J. & Harvima I.T.: The increase in tryptase- and chymase-positive mast cells is associated with partial inactivation of chymase and increase in protease inhibitors in basal cell carcinoma. *J Eur Acad Dermatol Venereol*, Aug 2007;21(7):908–15.
- [72] Gruber B.L.: Mast cells in scleroderma. *Clin Dermatol*, Jan 1994;12(3):397–406.
- [73] Pennock J.L. & Grecis R.K.: In vivo exit of c-kit+/CD49d(hi)/beta7+ mucosal mast cell precursors from the bone marrow following infection with the intestinal nematode *Trichinella spiralis*. *Blood*, Apr 2004;103(7):2655–60.
- [74] Dudeck A., Leist M., Rubant S., Zimmermann A., Dudeck J., Boehncke W.H. & Maurer M.: Immature mast cells exhibit rolling and adhesion to endothelial cells and subsequent diapedesis triggered by E- and P-selectin, VCAM-1 and PECAM-1. *Exp Dermatol*, May 2010;19(5):424–34.
- [75] Abonia J.P., Hallgren J., Jones T., Shi T., Xu Y., Koni P., Flavell R.A., Boyce J.A., Austen K.F. & Gurish M.F.: Alpha-4 integrins and VCAM-1, but not MAdCAM-1, are essential for recruitment of mast cell progenitors to the inflamed lung. *Blood*, Sep 2006;108(5):1588–94.
- [76] Hallgren J., Jones T.G., Abonia J.P., Xing W., Humbles A., Austen K.F. & Gurish M.F.: Pulmonary CXCR2 regulates VCAM-1 and antigen-induced recruitment of mast cell progenitors. *Proc Natl Acad Sci USA*, Dec 2007;104(51):20478–83.
- [77] Ruschpler P., Lorenz P., Eichler W., Koczan D., Hänel C., Scholz R., Melzer C., Thiesen H.J. & Stiehl P.: High CXCR3 expression in synovial mast cells associated with CXCL9 and CXCL10 expression in inflammatory synovial tissues of patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis research & therapy*, Jan 2003;5(5):R241–52.
- [78] Brightling C.E., Ammit A.J., Kaur D., Black J.L., Wardlaw A.J., Hughes J.M. & Bradding P.: The CXCL10/CXCR3 axis mediates human lung mast cell migration to asthmatic airway smooth muscle. *Am J Respir Crit Care Med*, May 2005;171(10):1103–8.
- [79] Huang E., Nocka K., Beier D.R., Chu T.Y., Buck J., Lahm H.W., Wellner D., Leder P. & Besmer P.: The hematopoietic growth factor KL is encoded by the Sl locus and is the ligand of the c-kit receptor, the gene product of the W locus. *Cell*, Oct 1990;63(1):225–33.

- [80] Williams D.E., de Vries P., Namen A.E., Widmer M.B. & Lyman S.D.: The Steel factor. *Dev Biol*, Jun 1992;151(2):368–76.
- [81] Zsebo K.M., Williams D.A., Geissler E.N., Broudy V.C., Martin F.H., Atkins H.L., Hsu R.Y., Birkett N.C., Okino K.H. & Murdock D.C.: Stem cell factor is encoded at the Sl locus of the mouse and is the ligand for the c-kit tyrosine kinase receptor. *Cell*, Oct 1990;63(1):213–24.
- [82] Zsebo K.M., Wypych J., McNiece I.K., Lu H.S., Smith K.A., Karkare S.B., Sachdev R.K., Yuschenkov V.N., Birkett N.C. & Williams L.R.: Identification, purification, and biological characterization of hematopoietic stem cell factor from buffalo rat liver-conditioned medium. *Cell*, Oct 1990;63(1):195–201.
- [83] Besmer P., Murphy J.E., George P.C., Qiu F.H., Bergold P.J., Lederman L., Snyder H.W., Brodeur D., Zuckerman E.E. & Hardy W.D.: A new acute transforming feline retrovirus and relationship of its oncogene v-kit with the protein kinase gene family. *Nature*, Jan 1986;320(6061):415–21.
- [84] Chabot B., Stephenson D.A., Chapman V.M., Besmer P. & Bernstein A.: The proto-oncogene c-kit encoding a transmembrane tyrosine kinase receptor maps to the mouse W locus. *Nature*, Sep 1988;335(6185):88–9.
- [85] Geissler E.N., Ryan M.A. & Housman D.E.: The dominant-white spotting (W) locus of the mouse encodes the c-kit proto-oncogene. *Cell*, Oct 1988;55(1):185–92.
- [86] Russell E.S.: Developmental studies of mouse hereditary anemias. *Am J Med Genet*, Aug 1984;18(4):621–41.
- [87] Geissler E.N., McFarland E.C. & Russell E.S.: Analysis of pleiotropism at the dominant white-spotting (W) locus of the house mouse: a description of ten new W alleles. *Genetics*, Feb 1981;97(2):337–61.
- [88] Copeland N.G., Gilbert D.J., Cho B.C., Donovan P.J., Jenkins N.A., Cosman D., Anderson D., Lyman S.D. & Williams D.E.: Mast cell growth factor maps near the steel locus on mouse chromosome 10 and is deleted in a number of steel alleles. *Cell*, Oct 1990;63(1):175–83.
- [89] Kitamura Y. & Go S.: Decreased production of mast cells in S1/S1d anemic mice. *Blood*, Mar 1979;53(3):492–7.
- [90] Mekori Y.A., Oh C.K. & Metcalfe D.D.: IL-3-dependent murine mast cells undergo apoptosis on removal of IL-3. Prevention of apoptosis by c-kit ligand. *J Immunol*, Oct 1993;151(7):3775–84.
- [91] Yee N.S., Paek I. & Besmer P.: Role of kit-ligand in proliferation and suppression of apoptosis in mast cells: basis for radiosensitivity of white spotting and steel mutant mice. *The Journal of Experimental Medicine*, Jun 1994;179(6):1777–87.
- [92] Finotto S., Mekori Y.A. & Metcalfe D.D.: Glucocorticoids decrease tissue mast cell number by reducing the production of the c-kit ligand, stem cell factor, by resident cells: in vitro and in vivo evidence in murine systems. *J Clin Invest*, Apr 1997;99(7):1721–8.
- [93] Iemura A., Tsai M., Ando A., Wershil B.K. & Galli S.J.: The c-kit ligand, stem cell factor, promotes mast cell survival by suppressing apoptosis. *The American journal of pathology*, Feb 1994;144(2):321–8.
- [94] Coleman J.W.: Nitric oxide: a regulator of mast cell activation and mast cell-mediated inflammation. *Clin Exp Immunol*, Jul 2002;129(1):4–10.

- [95] Columbo M., Horowitz E.M., Botana L.M., MacGlashan D.W., Bochner B.S., Gillis S., Zsebo K.M., Galli S.J. & Lichtenstein L.M.: The human recombinant c-kit receptor ligand, rhSCF, induces mediator release from human cutaneous mast cells and enhances IgE-dependent mediator release from both skin mast cells and peripheral blood basophils. *J Immunol*, Jul 1992;149(2):599–608.
- [96] Nakajima K., Hirai K., Yamaguchi M., Takaishi T., Ohta K., Morita Y. & Ito K.: Stem cell factor has histamine releasing activity in rat connective tissue-type mast cells. *Biochem Biophys Res Commun*, Mar 1992;183(3):1076–83.
- [97] Dasty J. & Metcalfe D.D.: Stem cell factor induces mast cell adhesion to fibronectin. *J Immunol*, Jan 1994;152(1):213–9.
- [98] Kinashi T. & Springer T.A.: Steel factor and c-kit regulate cell-matrix adhesion. *Blood*, Feb 1994;83(4):1033–8.
- [99] Adachi S., Ebi Y., Nishikawa S., Hayashi S., Yamazaki M., Kasugai T., Yamamura T., Nomura S. & Kitamura Y.: Necessity of extracellular domain of W (c-kit) receptors for attachment of murine cultured mast cells to fibroblasts. *Blood*, Feb 1992;79(3):650–6.
- [100] Gurish M.F., Ghildyal N., McNeil H.P., Austen K.F., Gillis S. & Stevens R.L.: Differential expression of secretory granule proteases in mouse mast cells exposed to interleukin 3 and c-kit ligand. *The Journal of Experimental Medicine*, Apr 1992;175(4):1003–12.
- [101] Tsai M., Shih L.S., Newlands G.F., Takeishi T., Langley K.E., Zsebo K.M., Miller H.R., Geissler E.N. & Galli S.J.: The rat c-kit ligand, stem cell factor, induces the development of connective tissue-type and mucosal mast cells in vivo. Analysis by anatomical distribution, histochemistry, and protease phenotype. *J Exp Med*, Jul 1991;174(1):125–31.
- [102] Flanagan J., Chan D. & Leder P.: Transmembrane form of the kit ligand growth factor is determined by alternative splicing and is missing in the SId mutant. *Cell*, 1991; 64(5):1025–1035.
- [103] Pandiella A., Bosenberg M.W., Huang E.J., Besmer P. & Massagué J.: Cleavage of membrane-anchored growth factors involves distinct protease activities regulated through common mechanisms. *J Biol Chem*, Nov 1992;267(33):24028–33.
- [104] Majumdar M., Feng L., Medlock E., Toksoz D. & Williams D.: Identification and mutation of primary and secondary proteolytic cleavage sites in murine stem cell factor cDNA yields biologically active, cell-associated protein. *Journal of Biological Chemistry*, 1994; 269(2):1237.
- [105] Reber L., Silva C.A.D. & Frossard N.: Stem cell factor and its receptor c-Kit as targets for inflammatory diseases. *European Journal of Pharmacology*, Mar 2006;533(1-3):327–40.
- [106] Anderson D., Lyman S., Baird A., Wignall J., Eisenman J., Rauch C., March C., Boswell H., Gimpel S. & Cosman D.: Molecular cloning of mast cell growth factor, a hematopoietin that is active in both membrane bound and soluble forms. *Cell*, 1990;63(1):235–243.
- [107] Miyazawa K., Williams D.A., Gotoh A., Nishimaki J., Broxmeyer H.E. & Toyama K.: Membrane-bound Steel factor induces more persistent tyrosine kinase activation and longer life span of c-kit gene-encoded protein than its soluble form. *Blood*, Feb 1995;85(3):641–9.
- [108] Lyman S.D. & Jacobsen S.E.: c-kit ligand and Flt3 ligand: stem/progenitor cell factors with overlapping yet distinct activities. *Blood*, Feb 1998;91(4):1101–34.

- [109] Yarden Y., Kuang W.J., Yang-Feng T., Coussens L., Munemitsu S., Dull T.J., Chen E., Schlessinger J., Francke U. & Ullrich A.: Human proto-oncogene c-kit: a new cell surface receptor tyrosine kinase for an unidentified ligand. *EMBO J*, Nov 1987;6(11):3341–51.
- [110] Zhang Z., Zhang R., Joachimiak A., Schlessinger J. & Kong X.P.: Crystal structure of human stem cell factor: implication for stem cell factor receptor dimerization and activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Jul 2000; 97(14):7732–7.
- [111] Ullrich A. & Schlessinger J.: Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity. *Cell*, Apr 1990;61(2):203–12.
- [112] Blalock W.L., Weinstein-Oppenheim C., Chang F., Hoyle P.E., Wang X.Y., Algate P.A., Franklin R.A., Oberhaus S.M., Steelman L.S. & McCubrey J.A.: Signal transduction, cell cycle regulatory, and anti-apoptotic pathways regulated by IL-3 in hematopoietic cells: possible sites for intervention with anti-neoplastic drugs. *Leukemia*, Aug 1999; 13(8):1109–66.
- [113] Nabel G., Galli S.J., Dvorak A.M., Dvorak H.F. & Cantor H.: Inducer T lymphocytes synthesize a factor that stimulates proliferation of cloned mast cells. *Nature*, May 1981; 291(5813):332–4.
- [114] Nagao K., Yokoro K. & Aaronson S.A.: Continuous lines of basophil/mast cells derived from normal mouse bone marrow. *Science*, Apr 1981;212(4492):333–5.
- [115] Razin E., Cordon-Cardo C. & Good R.A.: Growth of a pure population of mouse mast cells in vitro with conditioned medium derived from concanavalin A-stimulated splenocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Apr 1981; 78(4):2559–61.
- [116] Ihle J.N., Keller J., Oroszlan S., Henderson L.E., Copeland T.D., Fitch F., Prystowsky M.B., Goldwasser E., Schrader J.W., Palaszynski E. et al.: Biologic properties of homogeneous interleukin 3. I. Demonstration of WEHI-3 growth factor activity, mast cell growth factor activity, p cell-stimulating factor activity, colony-stimulating factor activity, and histamine-producing cell-stimulating factor activity. *J Immunol*, Jul 1983;131(1):282–7.
- [117] Razin E., Ihle J.N., Seldin D., Mencia-Huerta J.M., Katz H.R., LeBlanc P.A., Hein A., Caulfield J.P., Austen K.F. & Stevens R.L.: Interleukin 3: A differentiation and growth factor for the mouse mast cell that contains chondroitin sulfate E proteoglycan. *J Immunol*, Mar 1984;132(3):1479–86.
- [118] Madden K.B., Urban J.F., Ziltener H.J., Schrader J.W., Finkelman F.D. & Katona I.M.: Antibodies to IL-3 and IL-4 suppress helminth-induced intestinal mastocytosis. *J Immunol*, Aug 1991;147(4):1387–91.
- [119] Lantz C.S., Boesiger J., Song C.H., Mach N., Kobayashi T., Mulligan R.C., Nawa Y., Dranoff G. & Galli S.J.: Role for interleukin-3 in mast-cell and basophil development and in immunity to parasites. *Nature*, Mar 1998;392(6671):90–3.
- [120] Nakano T., Sonoda T., Hayashi C., Yamatodani A., Kanayama Y., Yamamura T., Asai H., Yonezawa T., Kitamura Y. & Galli S.J.: Fate of bone marrow-derived cultured mast cells after intracutaneous, intraperitoneal, and intravenous transfer into genetically mast cell-deficient W/W^v mice. Evidence that cultured mast cells can give rise to both connective tissue type and mucosal mast cells. *The Journal of experimental medicine*, Sep 1985;162(3):1025–43.

- [121] Yung Y.P. & Moore M.A.: Long-term in vitro culture of murine mast cells. III. Discrimination of mast cells growth factor and granulocyte-CSF. *J Immunol*, Sep 1982;129(3):1256–61.
- [122] Valent P.: Cytokines involved in growth and differentiation of human basophils and mast cells. *Exp Dermatol*, Aug 1995;4(4 Pt 2):255–9.
- [123] Nakahata T., Kobayashi T., Ishiguro A., Tsuji K., Naganuma K., Ando O., Yagi Y., Tadokoro K. & Akabane T.: Extensive proliferation of mature connective-tissue type mast cells in vitro. *Nature*, Jan 1986;324(6092):65–7.
- [124] Hamaguchi Y., Kanakura Y., Fujita J., Takeda S., Nakano T., Tarui S., Honjo T. & Kitamura Y.: Interleukin 4 as an essential factor for in vitro clonal growth of murine connective tissue-type mast cells. *J Exp Med*, Jan 1987;165(1):268–73.
- [125] Tsuji K., Zsebo K.M. & Ogawa M.: Murine mast cell colony formation supported by IL-3, IL-4, and recombinant rat stem cell factor, ligand for c-kit. *J. Cell. Physiol.*, Sep 1991; 148(3):362–9.
- [126] Mirmonsef P., Shelburne C.P., Yeatman C.F., Chong H.J. & Ryan J.J.: Inhibition of Kit expression by IL-4 and IL-10 in murine mast cells: role of STAT6 and phosphatidylinositol 3'-kinase. *J Immunol*, Sep 1999;163(5):2530–9.
- [127] Eklund K.K., Ghildyal N., Austen K.F. & Stevens R.L.: Induction by IL-9 and suppression by IL-3 and IL-4 of the levels of chromosome 14-derived transcripts that encode late-expressed mouse mast cell proteases. *J Immunol*, Oct 1993;151(8):4266–73.
- [128] Ghildyal N., McNeil H.P., Stechschulte S., Austen K.F., Silberstein D., Gurish M.F., Somerville L.L. & Stevens R.L.: IL-10 induces transcription of the gene for mouse mast cell protease-1, a serine protease preferentially expressed in mucosal mast cells of *Trichinella spiralis*-infected mice. *J Immunol*, Sep 1992;149(6):2123–9.
- [129] Ghildyal N., McNeil H.P., Gurish M.F., Austen K.F. & Stevens R.L.: Transcriptional regulation of the mucosal mast cell-specific protease gene, MMCP-2, by interleukin 10 and interleukin 3. *J Biol Chem*, Apr 1992;267(12):8473–7.
- [130] Thompson-Snipes L., Dhar V., Bond M.W., Mosmann T.R., Moore K.W. & Rennick D.M.: Interleukin 10: a novel stimulatory factor for mast cells and their progenitors. *The Journal of Experimental Medicine*, Feb 1991;173(2):507–10.
- [131] Hu Z.Q., Kobayashi K., Zenda N. & Shimamura T.: Tumor necrosis factor-alpha- and interleukin-6-triggered mast cell development from mouse spleen cells. *Blood*, Jan 1997; 89(2):526–33.
- [132] Yuan Q., Gurish M.F., Friend D.S., Austen K.F. & Boyce J.A.: Generation of a novel stem cell factor-dependent mast cell progenitor. *J Immunol*, Nov 1998;161(10):5143–6.
- [133] Matsuda H., Kannan Y., Ushio H., Kiso Y., Kanemoto T., Suzuki H. & Kitamura Y.: Nerve growth factor induces development of connective tissue-type mast cells in vitro from murine bone marrow cells. *J Exp Med*, Jul 1991;174(1):7–14.
- [134] Wright S.H., Brown J., Knight P.A., Thornton E.M., Kilshaw P.J. & Miller H.R.P.: Transforming growth factor-beta1 mediates coexpression of the integrin subunit alphaE and the chymase mouse mast cell protease-1 during the early differentiation of bone marrow-derived mucosal mast cell homologues. *Clin Exp Allergy*, Feb 2002;32(2):315–24.

- [135] Malbec O., Roget K., Schiffer C., Iannascoli B., Dumas A.R., Arock M. & Daëron M.: Peritoneal cell-derived mast cells: an in vitro model of mature serosal-type mouse mast cells. *J Immunol*, May 2007;178(10):6465–75.
- [136] Metz M., Piliponsky A.M., Chen C.C., Lammel V., Abrink M., Pejler G., Tsai M. & Galli S.J.: Mast cells can enhance resistance to snake and honeybee venoms. *Science*, Jul 2006; 313(5786):526–30.
- [137] Daëron M., Duc H.T., Kanellopoulos J., Bouteiller P.L., Kinsky R. & Voisin G.A.: Allogenic mast cell degranulation induced by histocompatibility antibodies: an in vitro model of transplantation anaphylaxis. *Cell Immunol*, Dec 1975;20(2):133–55.
- [138] Schrader J.W., Lewis S.J., Clark-Lewis I. & Culvenor J.G.: The persisting (P) cell: histamine content, regulation by a T cell-derived factor, origin from a bone marrow precursor, and relationship to mast cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Jan 1981;78(1):323–7.
- [139] DuBuske L., Austen K.F., Czop J. & Stevens R.L.: Granule-associated serine neutral proteases of the mouse bone marrow-derived mast cell that degrade fibronectin: their increase after sodium butyrate treatment of the cells. *J Immunol*, Sep 1984;133(3):1535–41.
- [140] Galli S.J., Dvorak A.M., Marcum J.A., Nabel G., Goldin J.M., Rosenberg R.D., Cantor H. & Dvorak H.F.: Mouse mast cell clones: modulation of functional maturity in vitro. *Monogr Allergy*, Jan 1983;18:166–70.
- [141] Serafin W.E., Sullivan T.P., Conder G.A., Ebrahimi A., Marcham P., Johnson S.S., Austen K.F. & Reynolds D.S.: Cloning of the cDNA and gene for mouse mast cell protease 4. Demonstration of its late transcription in mast cell subclasses and analysis of its homology to subclass-specific neutral proteases of the mouse and rat. *J Biol Chem*, Jan 1991; 266(3):1934–41.
- [142] Nocka K., Tan J.C., Chiu E., Chu T.Y., Ray P., Traktman P. & Besmer P.: Molecular bases of dominant negative and loss of function mutations at the murine c-kit/white spotting locus: W37, Wv, W41 and W. *EMBO J*, Jun 1990;9(6):1805–13.
- [143] Nocka K., Majumder S., Chabot B., Ray P., Cervone M., Bernstein A. & Besmer P.: Expression of c-kit gene products in known cellular targets of W mutations in normal and W mutant mice—evidence for an impaired c-kit kinase in mutant mice. *Genes & Development*, Jun 1989;3(6):816–26.
- [144] Duttlinger R., Manova K., Chu T.Y., Gyssler C., Zelenetz A.D., Bachvarova R.F. & Besmer P.: W-sash affects positive and negative elements controlling c-kit expression: ectopic c-kit expression at sites of kit-ligand expression affects melanogenesis. *Development*, Jul 1993; 118(3):705–17.
- [145] Berrozpe G., Timokhina I., Yukl S., Tajima Y., Ono M., Zelenetz A.D. & Besmer P.: The W(sh), W(57), and Ph Kit expression mutations define tissue-specific control elements located between -23 and -154 kb upstream of Kit. *Blood*, Oct 1999;94(8):2658–66.
- [146] Lyon M.F. & Glenister P.H.: A new allele sash (Wsh) at the W-locus and a spontaneous recessive lethal in mice. *Genet Res*, Jun 1982;39(3):315–22.
- [147] Stevens J. & Loutit J.F.: Mast cells in spotted mutant mice (W Ph mi). *Proc R Soc Lond, B, Biol Sci*, Jun 1982;215(1200):405–9.

- [148] Fujita J., Nakayama H., Onoue H., Ebi Y., Kanakura Y., Kuriu A. & Kitamura Y.: Failure of W/W^v mouse-derived cultured mast cells to enter S phase upon contact with NIH/3T3 fibroblasts. *Blood*, Aug 1988;72(2):463–8.
- [149] Tono T., Tsujimura T., Koshimizu U., Kasugai T., Adachi S., Isozaki K., Nishikawa S., Morimoto M., Nishimune Y. & Nomura S.: c-kit Gene was not transcribed in cultured mast cells of mast cell-deficient Wsh/Wsh mice that have a normal number of erythrocytes and a normal c-kit coding region. *Blood*, Sep 1992;80(6):1448–53.
- [150] Ginsburg H. & Lagunoff D.: The in vitro differentiation of mast cells. Cultures of cells from immunized mouse lymph nodes and thoracic duct lymph on fibroblast monolayers. *J Cell Biol*, Dec 1967;35(3):685–97.
- [151] Davidson S., Mansour A., Gallily R., Smolarski M., Rofolovitch M. & Ginsburg H.: Mast cell differentiation depends on T cells and granule synthesis on fibroblasts. *Immunology*, Mar 1983;48(3):439–52.
- [152] Levi-Schaffer F., Austen K.F., Caulfield J.P., Hein A., Bloes W.F. & Stevens R.L.: Fibroblasts maintain the phenotype and viability of the rat heparin-containing mast cell in vitro. *J Immunol*, Nov 1985;135(5):3454–62.
- [153] Levi-Schaffer F., Austen K.F., Gravalles P.M. & Stevens R.L.: Coculture of interleukin 3-dependent mouse mast cells with fibroblasts results in a phenotypic change of the mast cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Sep 1986;83(17):6485–8.
- [154] Levi-Schaffer F., Dayton E.T., Austen K.F., Hein A., Caulfield J.P., Gravalles P.M., Liu F.T. & Stevens R.L.: Mouse bone marrow-derived mast cells cocultured with fibroblasts. Morphology and stimulation-induced release of histamine, leukotriene B₄, leukotriene C₄, and prostaglandin D₂. *J Immunol*, Nov 1987;139(10):3431–41.
- [155] Fujita J., Nakayama H., Onoue H., Kanakura Y., Nakano T., Asai H., Takeda S., Honjo T. & Kitamura Y.: Fibroblast-dependent growth of mouse mast cells in vitro: duplication of mast cell depletion in mutant mice of W/W^v genotype. *J. Cell. Physiol.*, Jan 1988;134(1):78–84.
- [156] Fujita J., Onoue H., Ebi Y., Nakayama H. & Kanakura Y.: In vitro duplication and in vivo cure of mast-cell deficiency of Sl/Sld mutant mice by cloned 3T3 fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci USA*, Apr 1989;86(8):2888–91.
- [157] Onoue H., Ebi Y., Nakayama H., Ru X.M., Kitamura Y. & Fujita J.: Suppressive effect of Sl/Sld mouse embryo-derived fibroblast cell lines on diffusible factor-dependent proliferation of mast cells. *Blood*, Oct 1989;74(5):1557–62.
- [158] Matsuda H., Kawakita K., Kiso Y., Nakano T. & Kitamura Y.: Substance P induces granulocyte infiltration through degranulation of mast cells. *J Immunol*, Feb 1989;142(3):927–31.
- [159] Kameyoshi Y., Morita E., Tanaka T., Hiragun T. & Yamamoto S.: Interleukin-1 alpha enhances mast cell growth by a fibroblast-dependent mechanism. *Arch Dermatol Res*, May 2000;292(5):240–7.
- [160] Hiragun T., Morita E., Mihara S., Tanaka T., Gytoku E., Kameyoshi Y. & Yamamoto S.: Leukemia inhibitory factor enhances mast cell growth in a mast cell/fibroblast co-culture system through stat3 signaling pathway of fibroblasts. *FEBS Lett*, Dec 2000;487(2):219–23.

- [161] Gytoku E., Morita E., Kameyoshi Y., Hiragun T., Yamamoto S. & Hide M.: The IL-6 family cytokines, interleukin-6, interleukin-11, oncostatin M, and leukemia inhibitory factor, enhance mast cell growth through fibroblast-dependent pathway in mice. *Arch Dermatol Res*, Nov 2001;293(10):508–14.
- [162] Levi-Schaffer F. & Rubinchik E.: Mast cell/fibroblast interactions. *Clin Exp Allergy*, Nov 1994;24(11):1016–21.
- [163] Takano H., Nakazawa S., Okuno Y., Shirata N., Tsuchiya S., Kainoh T., Takamatsu S., Furuta K., Taketomi Y., Naito Y. et al.: Establishment of the culture model system that reflects the process of terminal differentiation of connective tissue-type mast cells. *FEBS Lett*, Apr 2008; 582(10):1444–50.
- [164] Takano H., Nakazawa S., Shirata N., Tamba S., Furuta K., Tsuchiya S., Morimoto K., Itano N., Irie A., Ichikawa A. et al.: Involvement of CD44 in mast cell proliferation during terminal differentiation. *Lab Invest*, Apr 2009;89(4):446–55.
- [165] Metcalfe D.D., Baram D. & Mekori Y.A.: Mast cells. *Physiological Reviews*, Oct 1997; 77(4):1033–79.
- [166] Sugiura H. & Uehara M.: Mitosis of mast cells in skin lesions of atopic dermatitis. *Acta Derm Venereol*, Aug 1993;73(4):296–9.
- [167] Grabbe J., Haas N. & Czarnetzki B.M.: [The mast cell]. *Hautarzt*, Jan 1994;45(1):55–63; quiz 64.
- [168] Kitamura Y., SHIMADA M. & Go S.: Presence of mast cell precursors in fetal liver of mice. *Dev Biol*, Jun 1979;70(2):510–4.
- [169] Hayashi C., Sonoda T., Nakano T., Nakayama H. & Kitamura Y.: Mast-cell precursors in the skin of mouse embryos and their deficiency in embryos of Sl/Sld genotype. *Dev Biol*, May 1985;109(1):234–41.
- [170] Karasuyama H., Rolink A. & Melchers F.: Recombinant interleukin 2 or 5, but not 3 or 4, induces maturation of resting mouse B lymphocytes and propagates proliferation of activated B cell blasts. *The Journal of Experimental Medicine*, Apr 1988;167(4):1377–90.
- [171] Saiki R.K., Scharf S., Faloona F., Mullis K.B., Horn G.T., Erlich H.A. & Arnheim N.: Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*, Dec 1985;230(4732):1350–4.
- [172] Pfaffl M.W.: A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res*, May 2001;29(9):e45.
- [173] Levi-Schaffer F., Austen K.F., Caulfield J.P., Hein A., Gravalles P.M. & Stevens R.L.: Co-culture of human lung-derived mast cells with mouse 3T3 fibroblasts: morphology and IgE-mediated release of histamine, prostaglandin D₂, and leukotrienes. *J Immunol*, Jul 1987; 139(2):494–500.
- [174] Dayton E.T., Pharr P., Ogawa M., Serafin W.E., Austen K.F., Levi-Schaffer F. & Stevens R.L.: 3T3 fibroblasts induce cloned interleukin 3-dependent mouse mast cells to resemble connective tissue mast cells in granular constituency. *Proc Natl Acad Sci USA*, Jan 1988; 85(2):569–72.

- [175] Katz H.R., Dayton E.T., Levi-Schaffer F., Benson A.C., Austen K.F. & Stevens R.L.: Coculture of mouse IL-3-dependent mast cells with 3T3 fibroblasts stimulates synthesis of globopentaosylceramide (Forssman glycolipid) by fibroblasts and surface expression on both populations. *J Immunol*, May 1988;140(9):3090–7.
- [176] Kahlson G. & Rosengren E.: Biogenesis and physiology of histamine. *Monogr Physiol Soc*, Jan 1971;21:1–318.
- [177] Ebi Y., Kasugai T., Seino Y., Onoue H., Kanemoto T. & Kitamura Y.: Mechanism of mast cell deficiency in mutant mice of mi/mi genotype: an analysis by co-culture of mast cells and fibroblasts. *Blood*, Mar 1990;75(6):1247–51.
- [178] Newlands G.F., Gibson S., Knox D.P., Grecis R., Wakelin D. & Miller H.R.: Characterization and mast cell origin of a chymotrypsin-like proteinase isolated from intestines of mice infected with *Trichinella spiralis*. *Immunology*, Dec 1987;62(4):629–34.
- [179] Reynolds D.S., Stevens R.L., Lane W.S., Carr M.H., Austen K.F. & Serafin W.E.: Different mouse mast cell populations express various combinations of at least six distinct mast cell serine proteases. *Proc Natl Acad Sci USA*, Apr 1990;87(8):3230–4.
- [180] Reynolds D.S., Stevens R.L., Gurley D.S., Lane W.S., Austen K.F. & Serafin W.E.: Isolation and molecular cloning of mast cell carboxypeptidase A. A novel member of the carboxypeptidase gene family. *J Biol Chem*, Nov 1989;264(33):20094–9.
- [181] Serafin W.E., Reynolds D.S., Rogelj S., Lane W.S., Conder G.A., Johnson S.S., Austen K.F. & Stevens R.L.: Identification and molecular cloning of a novel mouse mucosal mast cell serine protease. *J Biol Chem*, Jan 1990;265(1):423–9.
- [182] McNeil H.P., Frenkel D.P., Austen K.F., Friend D.S. & Stevens R.L.: Translation and granule localization of mouse mast cell protease-5. Immunodetection with specific antipeptide Ig. *J Immunol*, Oct 1992;149(7):2466–72.
- [183] Serafin W.E., Dayton E.T., Gravalles P.M., Austen K.F. & Stevens R.L.: Carboxypeptidase A in mouse mast cells. Identification, characterization, and use as a differentiation marker. *J Immunol*, Dec 1987;139(11):3771–6.
- [184] Rege T.A. & Hagood J.S.: Thy-1, a versatile modulator of signaling affecting cellular adhesion, proliferation, survival, and cytokine/growth factor responses. *Biochim Biophys Acta*, Oct 2006;1763(10):991–9.
- [185] Saalbach A., Wetzel A., Haustein U.F., Sticherling M., Simon J.C. & Andereg U.: Interaction of human Thy-1 (CD 90) with the integrin α v β 3 (CD51/CD61): an important mechanism mediating melanoma cell adhesion to activated endothelium. *Oncogene*, Jul 2005;24(29):4710–20.
- [186] Lévesque J.P., Leavesley D.I., Niutta S., Vadas M. & Simmons P.J.: Cytokines increase human hemopoietic cell adhesiveness by activation of very late antigen (VLA)-4 and VLA-5 integrins. *The Journal of Experimental Medicine*, May 1995;181(5):1805–15.
- [187] Kovach N.L., Lin N., Yednock T., Harlan J.M. & Broudy V.C.: Stem cell factor modulates avidity of α 4 β 1 and α 5 β 1 integrins expressed on hematopoietic cell lines. *Blood*, Jan 1995;85(1):159–67.
- [188] Tan B.L., Yazicioglu M.N., Ingram D., McCarthy J., Borneo J., Williams D.A. & Kapur R.: Genetic evidence for convergence of c-Kit- and α 4 integrin-mediated signals on class

- IA PI-3kinase and the Rac pathway in regulating integrin-directed migration in mast cells. *Blood*, Jun 2003;101(12):4725–32.
- [189] Lu H.S., Clogston C.L., Wypych J., Fausset P.R., Lauren S., Mendiaz E.A., Zsebo K.M. & Langley K.E.: Amino acid sequence and post-translational modification of stem cell factor isolated from buffalo rat liver cell-conditioned medium. *J Biol Chem*, May 1991; 266(13):8102–7.
- [190] Arakawa T., Langley K.E., Kameyama K. & Takagi T.: Molecular weights of glycosylated and nonglycosylated forms of recombinant human stem cell factor determined by low-angle laser light scattering. *Analytical Biochemistry*, May 1992;203(1):53–7.
- [191] Yamazaki M., Tsujimura T., Morii E., Isozaki K., Onoue H., Nomura S. & Kitamura Y.: C-kit gene is expressed by skin mast cells in embryos but not in puppies of Wsh/Wsh mice: age-dependent abolishment of c-kit gene expression. *Blood*, Jun 1994;83(12):3509–16.
- [192] Kaneko Y., Takenawa J., Yoshida O., Fujita K., Sugimoto K., Nakayama H. & Fujita J.: Adhesion of mouse mast cells to fibroblasts: adverse effects of steel (Sl) mutation. *J. Cell. Physiol.*, May 1991;147(2):224–30.
- [193] Tan J.C., Nocka K., Ray P., Traktman P. & Besmer P.: The dominant W42 spotting phenotype results from a missense mutation in the c-kit receptor kinase. *Science*, Jan 1990; 247(4939):209–12.
- [194] Serve H., Yee N.S., Stella G., Sepp-Lorenzino L., Tan J.C. & Besmer P.: Differential roles of PI3-kinase and Kit tyrosine 821 in Kit receptor-mediated proliferation, survival and cell adhesion in mast cells. *EMBO J*, Feb 1995;14(3):473–83.
- [195] Dastych J., Taub D., Hardison M.C. & Metcalfe D.D.: Tyrosine kinase-deficient Wv c-kit induces mast cell adhesion and chemotaxis. *Am J Physiol*, Nov 1998;275(5 Pt 1):C1291–9.
- [196] Matsushima H., Yamada N., Matsue H. & Shimada S.: The effects of endothelin-1 on degranulation, cytokine, and growth factor production by skin-derived mast cells. *Eur J Immunol*, Jul 2004;34(7):1910–9.
- [197] Arai H., Hori S., Aramori I., Ohkubo H. & Nakanishi S.: Cloning and expression of a cDNA encoding an endothelin receptor. *Nature*, Jan 1990;348(6303):730–2.
- [198] Matsue H., Kambe N. & Shimada S.: Murine fetal skin-derived cultured mast cells: a useful tool for discovering functions of skin mast cells. *The Journal of Investigative Dermatology*, May 2009;129(5):1120–5.
- [199] Yamada N., Matsushima H., Tagaya Y., Shimada S. & Katz S.I.: Generation of a large number of connective tissue type mast cells by culture of murine fetal skin cells. *The Journal of investigative dermatology*, Dec 2003;121(6):1425–32.
- [200] Bienenstock J., Befus A., Pearce F., Denburg J. & Goodacre R.: Mast cell heterogeneity: derivation and function, with emphasis on the intestine. *The Journal of allergy and clinical immunology*, 1982;70(6):407. TY - JOUR.
- [201] Laurent T.C., Laurent U.B. & Fraser J.R.: The structure and function of hyaluronan: An overview. *Immunol Cell Biol*, Apr 1996;74(2):A1–7.
- [202] Ferrara N., Houck K., Jakeman L. & Leung D.W.: Molecular and biological properties of the vascular endothelial growth factor family of proteins. *Endocr Rev*, Feb 1992;13(1):18–32.

- [203] Ferrara N.: Vascular endothelial growth factor. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, Jun 2009; 29(6):789–91.
- [204] Boesiger J., Tsai M. & Maurer... M.: Mast Cells Can Secrete Vascular Permeability Factor/Vascular Endothelial Cell Growth Factor and Exhibit Enhanced Release after Immunoglobulin E-dependent *The Journal of ...*, Jan 1998;.
- [205] Fan... L.: Immunohistochemical localization of vascular endothelial growth factor in the globule leukocyte/mucosal mast cell of the rat respiratory and digestive tracts. *Histochemistry and cell biology*, Jan 1999;.
- [206] Gombert M., Dieu-Nosjean M.C., Winterberg F., Bünemann E., Kubitza R.C., Cunha L.D., Haahtela A., Lehtimäki S., Müller A., Rieker J. et al.: CCL1-CCR8 interactions: an axis mediating the recruitment of T cells and Langerhans-type dendritic cells to sites of atopic skin inflammation. *J Immunol*, Apr 2005;174(8):5082–91.
- [207] Maurer M. & von Stebut E.: Macrophage inflammatory protein-1. *Int J Biochem Cell Biol*, Oct 2004;36(10):1882–6.
- [208] Biedermann T., Kneilling M., Mailhammer R., Maier K., Sander C.A., Kollias G., Kunkel S.L., Hültner L. & Röcken M.: Mast cells control neutrophil recruitment during T cell-mediated delayed-type hypersensitivity reactions through tumor necrosis factor and macrophage inflammatory protein 2. *J Exp Med*, Nov 2000;192(10):1441–52.
- [209] Neville L.F., Mathiak G. & Bagasra O.: The immunobiology of interferon-gamma inducible protein 10 kD (IP-10): a novel, pleiotropic member of the C-X-C chemokine superfamily. *Cytokine Growth Factor Rev*, Sep 1997;8(3):207–19.
- [210] Bazan J.F., Bacon K.B., Hardiman G., Wang W., Soo K., Rossi D., Greaves D.R., Zlotnik A. & Schall T.J.: A new class of membrane-bound chemokine with a CX3C motif. *Nature*, Feb 1997;385(6617):640–4.
- [211] Imai T., Hieshima K., Haskell C., Baba M., Nagira M., Nishimura M., Kakizaki M., Takagi S., Nomiya H., Schall T.J. et al.: Identification and molecular characterization of fractalkine receptor CX3CR1, which mediates both leukocyte migration and adhesion. *Cell*, Nov 1997;91(4):521–30.
- [212] Papadopoulos E.J., Fitzhugh D.J., Tkaczyk C., Gilfillan A.M., Sasseti C., Metcalfe D.D. & Hwang S.T.: Mast cells migrate, but do not degranulate, in response to fractalkine, a membrane-bound chemokine expressed constitutively in diverse cells of the skin. *Eur J Immunol*, Aug 2000;30(8):2355–61.
- [213] Clover A.J.P., Kumar A.H.S. & Caplice N.M.: Deficiency of CX3CR1 delays burn wound healing and is associated with reduced myeloid cell recruitment and decreased sub-dermal angiogenesis. *Burns*, Dec 2011;37(8):1386–93.
- [214] Oberlin E., Amara A., Bachelier F., Bessia C., Virelizier J.L., Arenzana-Seisdedos F., Schwartz O., Heard J.M., Clark-Lewis I., Legler D.F. et al.: The CXC chemokine SDF-1 is the ligand for LESTR/fusin and prevents infection by T-cell-line-adapted HIV-1. *Nature*, Aug 1996;382(6594):833–5.
- [215] Bleul C.C., Farzan M., Choe H., Parolin C., Clark-Lewis I., Sodroski J. & Springer T.A.: The lymphocyte chemoattractant SDF-1 is a ligand for LESTR/fusin and blocks HIV-1 entry. *Nature*, Aug 1996;382(6594):829–33.

-
- [216] Pablos J.L., Amara A., Bouloc A., Santiago B., Caruz A., Galindo M., Delaunay T., Virelizier J.L. & Arenzana-Seisdedos F.: Stromal-cell derived factor is expressed by dendritic cells and endothelium in human skin. *Am J Pathol*, Nov 1999;155(5):1577–86.
- [217] Põlajeva J., Sjösten A.M., Lager N., Kastemar M., Waern I., Alafuzoff I., Smits A., Westermarck B., Pejler G., Uhrbom L. et al.: Mast cell accumulation in glioblastoma with a potential role for stem cell factor and chemokine CXCL12. *PLoS ONE*, Jan 2011; 6(9):e25222.
- [218] Juremalm M., Hjertson M., Olsson N., Harvima I., Nilsson K. & Nilsson G.: The chemokine receptor CXCR4 is expressed within the mast cell lineage and its ligand stromal cell-derived factor-1alpha acts as a mast cell chemotaxin. *Eur J Immunol*, Dec 2000;30(12):3614–22.
- [219] Lin T.J., Issekutz T.B. & Marshall J.S.: SDF-1 induces IL-8 production and transendothelial migration of human cord blood-derived mast cells. *International Archives of Allergy and Immunology*, Jan 2001;124(1-3):142–5.
- [220] Matsuura J., Sakanaka M., Sato N., Ichikawa A. & Tanaka S.: Suppression of CXCR4 expression in mast cells upon IgE-mediated antigen stimulation. *Inflamm Res*, Feb 2010; 59(2):123–7.

Publikationen

Wissenschaftliche Artikel

Dudeck A., **Leist M.**, Rubant S., Zimmermann A., Dudeck J., Boehncke WH. & Maurer M.: Immature mast cells exhibit rolling and adhesion to endothelial cells and subsequent diapedesis triggered by E- and P-selectin, VCAM-1 and PECAM-1. *Experimental dermatology*. 2010 May 1;19(5):424-34

Drube S., Heink S., Walter S., Löhn T., **Grusser M.**, Gerbaulet A., Berod L., Schons J., Dudeck A., Freitag J., et al.: The receptor tyrosine kinase c-Kit controls IL-33 receptor signaling in mast cells. *Blood*. 2010 May 13;115(19):3899-906

Wissenschaftliche Vorträge

Sünder C.A., **Leist M.**, Steinhoff M., Dudeck A. & Maurer M., “Mast cells are critical for the limitation of thrombin- induced inflammation”, 1. International Mast Cell and Basophil Meeting (MCBM), 09.12. - 10.12.2010 in Berlin

Leist M., Maurer M. & Dudeck A., “Mast cell differentiation is promoted by adhesion to fibroblasts via both Kit - dependent and - independent pathways”, 37. Jahrestagung der Arbeitsgruppe Dermatologische Forschung (ADF), 18.02. - 20.02.2010 in Lübeck

Grusser M., Maurer M., & Dudeck A., “Mast cell proliferation and differentiation is promoted by adhesion to fibroblasts”, 21. Mainzer Allergie - Workshop, Gesellschaft für Allergologie und klinische Immunologie (DGAKI), 19.03. - 20.03.2009 in Mainz

Grusser M., Maurer M. & Dudeck A., “Mast cell proliferation and differentiation is promoted by adhesion to fibroblasts ”, 12. Jahrestreffen der Arbeitsgruppe Mastzellen und Basophile der Arbeitsgruppe Dermatologische Forschung (AGMZB), 03.12 - 04.12. 2008 in Berlin

Grusser M., Zimmermann A., Sünder C.A., Maurer M., Dudeck A., “VEGF, IL-4, and IL-15 and promote immature mast cell adhesion to skin endothelial cells, transendothelial migration and chemotaxis”, 20. Mainzer Allergie - Workshop, Deutsche Gesellschaft für Allergologie und klinische Immunologie (DGAKI), 07.03. - 08.03.2008 in Mainz

Sünder C.A., **Grusser M.**, Seeliger S., Steinhoff M., Maurer M., & Dudeck A., “Murine mast cell proliferation and apoptosis is regulated by activation of Proteinase-activated receptors”, 20. Mainzer Allergie - Workshop, Deutsche Gesellschaft für Allergologie und klinische Immunologie (DGAKI), 07.03. - 08.03.2008 in Mainz

Wissenschaftliche Poster

Leist M., Sünder C.A., Metz M., Dudeck A. & Maurer M., “Fibroblast-induced mast cell differentiation promoted by kit-dependent and kit-independent pathways requires direct adhesion via VCAM-1 and $\alpha_4\beta_7$ integrin”, 38. Jahrestagung der Arbeitsgruppe Dermatologische Forschung (ADF), 19.02. - 23.02.2011 in Tübingen

C.A. Sünder, **Leist M.**, Åbrink M., Steinhoff M., Dudeck A. & Maurer M., “Mast cells are critical for the limitation of thrombin- induced inflammation”, 38. Jahrestagung der Arbeitsgruppe Dermatologische Forschung (ADF), 19.02. - 23.02.2011 in Tübingen

Leist M., Sünder C.A., Metz M., Dudeck A. & Maurer M., “Fibroblast-induced mast cell differentiation promoted by Kit-dependent and Kit-independent pathways requires direct adhesion via VCAM-1 and $\alpha_4\beta_7$ integrin”, 1. International Mast Cell and Basophil Meeting (MCBM), 09.12. - 10.12.2010 in Berlin

Sünder C.A., **Leist M.**, Steinhoff M., Dudeck A. & Maurer M., “Mast cells are critical for the limitation of thrombin- induced inflammation”, 1. International Mast Cell and Basophil Meeting (MCBM), 09.12. - 10.12.2010 in Berlin

Leist M., Maurer M. & Dudeck A., “Mast cell differentiation is promoted by adhesion to fibroblasts via both Kit - dependent and - independent pathways”, 37. Jahrestagung der Arbeitsgruppe Dermatologische Forschung (ADF), 18.02. - 20.02.2010 in Lübeck

Sünder C.A., **Leist M.**, Seeliger S., Steinhoff M., Maurer M. & Dudeck A., “Modulation of mast cell biology by thrombin via proteinase-activated receptors (PARs)”, 37. Jahrestagung der Arbeitsgruppe Dermatologische Forschung (ADF), 18.02. - 20.02.2010 in Lübeck

Grusser M., Maurer M. & Dudeck A., “Mast cell proliferation and differentiation is promoted by adhesion to fibroblasts via both Kit - dependent and - independent pathways”, 2. European Congress of Immunology (ECI), 13.09. - 16.09.2009 in Berlin

Sünder C.A., **Grusser M.**, Seeliger S., Steinhoff M., Maurer M., Dudeck A., “Impact of thrombin on murine mast cell function via Proteinase- activated receptors”, 2. European Congress of Immunology (ECI), 13.09. - 16.09.2009 in Berlin

Sünder C.A., **Grusser M.**, Seeliger S., Steinhoff M., Maurer M. & Dudeck A., “Impact of thrombin on murine mast cell function via proteinase-activated receptors”, 39. Jahrestreffen der European Society for Dermatological Research (ESDR), 10.09. - 12.09.2009 in Budapest

Grusser M., Maurer M. & Dudeck A., “Mast cell proliferation and differentiation is promoted by adhesion to fibroblasts”, 36. Jahrestagung der Arbeitsgruppe Dermatologische Forschung (ADF), 05.03. - 07.03.2009 in Heidelberg

Zimmermann A., **Grusser M.**, Maurer M. & Dudeck A., “IL-4 and IL-15 promote immature mast cell adhesion to skin endothelial cells and chemotaxis”, 36. Jahrestagung der Arbeitsgruppe Dermatologische Forschung (ADF), 28.02. - 01.03.2008 in Erlangen

Zimmermann A., **Grusser M.**, Maurer M., Dudeck A., “IL-4 and IL-15 promote immature mast cell adhesion to endothelial cells and chemotaxis”, 37. Jahrestreffen der European Society for Dermatological Research (ESDR), 05.09. - 08.09.2007 in Zürich

Sünder C.A., **Grusser M.**, Maurer M., Dudeck A. & Steinhoff M. “Murine mast cells express Proteinase-activated receptors 1-4 and migrate towards their ligands”, 37. Jahrestreffen der European Society for Dermatological Research (ESDR), 05.09. - 08.09.2007 in Zürich

Berlin, den 30. Juli 2012

Mandy Leist

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig angefertigt und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel verwendet habe. Diese Arbeit wurde weder in gleicher, noch in ähnlicher Form in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegt. Ich habe in keinem früheren Verfahren einen akademischen Grad erworben oder zu erwerben versucht. Die dem angestrebten Promotionsverfahren an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I der Humboldt-Universität zu Berlin zugrunde liegende Promotionsordnung ist mir bekannt.

Berlin, den 30. Juli 2012

Mandy Leist